

# **Modulation der Zytokinexpression durch experimentelle Photopherese**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Peric, Adriana  
aus Kelheim

Gießen  
2013

Aus dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Meyle

Tag der Disputation: 21.11.2014

MEINEN ELTERN  
UND SHARON

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.1.1. Monozyten und das Mononukleäre Phagozyten System.....	2
1.1.2. Dendritische Zellen.....	3
1.1.3. Cluster of differentiation.....	5
1.1.4. Zytokine.....	7
1.2. Extrakorporeale Photopherese (ECP).....	9
1.2.1. Prinzip der Extrakorporealen Photopherese (ECP).....	9
1.2.2. Entwicklung der ECP als Therapie des CTCL.....	10
1.2.3. ECP bei Graft-versus-Host-Disease (GvHD).....	11
1.2.4. Wirkmechanismus der ECP.....	13
1.2.5. ECP-selektive Immunkontrolle ohne generalisierte Immunsuppression?.....	14
1.2.6. Die Impftheorie.....	14
1.2.7. Induktion von regulatorischen T-Zellen.....	15
1.2.8. Modulation der Zytokinproduktion.....	16
<b>2. Fragestellung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1. Material.....	19
3.1.1. Geräte.....	19
3.1.2. Zellmaterial.....	20
3.1.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	20
3.1.4. Kulturmedien.....	21
3.1.5. Stimulantien/ Inhibitoren.....	21
3.1.6. Antikörper.....	21
3.1.7. Micro Beads.....	22
3.1.8. Fertige Reagenzienkits.....	22

3.1.9. Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.10. Computersoftware.....	23
3.2. Methoden.....	24
3.2.1. Isolation von PBMC.....	24
3.2.2. Bestimmung der Zellzahl.....	25
3.2.3. Separation von CD14 positiven Monozyten mit dem AutoMACs™ (automated Magnetic Activating Cell Sorting).....	25
3.2.4. Reinheitskontrolle der Monozyten am Durchflusszytometer..	26
3.2.5. Photopheresebehandlung von PBMC's und Monozyten.....	27
3.2.6. Apoptosemessung mit 7-AAD und Annexin V.....	28
3.2.7. Proliferationstest.....	29
3.2.8. Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie.....	30
3.2.9. Stimulation der Zellen mit LPS und R848.....	31
3.2.10. Stimulation der Zellen mit CD3 und CD28.....	31
3.2.11. Zytokinnachweis im Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	32
3.2.12. Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometer.....	33
3.2.13. Inhibierung der Zytokinproduktion mittels Caspase-Inhibitor.....	35
3.2.14. Statistische Analysen.....	35
4. Ergebnisse.....	36
4.1. Validierung der experimentellen Photopherese: Apoptoseinduktion.....	36
4.2. Validierung der experimentellen Photopherese: Proliferationshemmung von Lymphozyten.....	39
4.3. Photopherese stimuliert die Expressierung von Kostimulatormolekülen.....	41

4.4. Photopherese inhibiert die Produktion von IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70 und INF- $\gamma$ in PBMC.....	46
4.5. Photopherese in niedriger Bestrahlungsstärke stimuliert die Produktion von IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ .....	50
4.6. Veränderungen der Zytokinproduktion von Photopherese behandelten Monozyten korreliert mit den Ergebnissen bei PBMC.....	51
4.7. Die experimentelle Photopherese führt zu einem selektiven Überleben von CD14+ Monozyten.....	53
4.8. Pancaspase-Inhibitor führt zu einer erniedrigten Produktion von IL-1 $\beta$ und IL-18 nach experimenteller Photopherese in niedriger Bestrahlungsstärke.....	57
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>59</b>
5.1. Selektive Apoptoseinduktion durch Bestrahlung mit UVA.....	59
5.2. 8-MOP spielt eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit der ECP.....	60
5.3. Proliferationstest besser zur Validierung geeignet.....	61
5.4. Die ECP aktiviert Monozyten.....	62
5.5. ECP supprimiert und stimuliert Zytokinproduktion.....	62
5.6. Führt die ECP zur Induktion des Inflammasoms?.....	64
5.7. Klinische Bedeutung der Ergebnisse.....	66
<b>6. Summary</b> .....	<b>69</b>

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
---------------------------	-----------

<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>71</b>
---------------------------------	-----------

<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
--------------------------------	-----------

<b>10. Publikationsverzeichnis</b>	<b>82</b>
------------------------------------	-----------

<b>Erklärung zur Dissertation</b>	<b>83</b>
-----------------------------------	-----------

<b>Danksagung</b>	<b>84</b>
-------------------	-----------

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus der angeborenen Immunität und der Antigen-spezifischen, adaptiven Immunität [1]. Die angeborene Immunität funktioniert durch Abwehrmechanismen, die schon vor der Infektion vorhanden sind, und stellt die erste Front gegenüber Infektionen und unbekannten Pathogenen dar, wohingegen die adaptive Immunität erst durch die Exposition gegenüber Mikroorganismen aktiviert wird. [2].

Die wichtigsten Bestandteile der angeborenen Immunität sind mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, zellvermittelte Abwehr durch Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen und lösliche Plasmaproteine wie Zytokine und Komponenten des Komplementsystems [2]. Leukozyten und Epithelzellen erkennen Mikroorganismen mit Hilfe ihrer *Pattern-recognition* Rezeptoren (PRRs) [3]. Diese binden an unveränderliche Molekularstrukturen, die auf mehreren unterschiedlichen Pathogenen zu finden sind, wie das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) oder doppelsträngige Viren- DNA [1] und als *Pathogen associated molecular patterns* bezeichnet werden. Die am besten definierten *pattern recognition* Rezeptoren sind die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) [4]. TLRs befinden sich auf der Zelloberfläche und in den Endosomen, so können extrazelluläre ebenso wie phagozytierte Erreger erkannt und die entsprechende Immunantwort eingeleitet werden [2]. Während der frühen Immunantwort finden regulatorische Prozesse zwischen den Zellen statt, die hauptsächlich durch Zytokine gesteuert werden. Sie sind unter anderem für die Aktivierung von Phagozyten und Natürlichen Killer Zellen und deren Migration an den Ort der Entzündungsreaktion verantwortlich [5]. Von zentraler Bedeutung für eine funktionierende Immunabwehr ist, zum einen die Erkennung von Noxen und Gewebeverletzungen, zum anderen die Weiterleitung dieser Gefahrensignale an das adaptive Immunsystem [6].

Die adaptive Immunabwehr besteht aus den Lymphozyten und den von ihnen produzierten Antikörpern [2] und besitzt die Fähigkeit, sich durch Rearrangierung der für die Immunglobuline codierenden Gene, an neue Krankheitserreger anzupassen und eine Vielzahl von Antigen-spezifischen Klonen herzustellen. [7]. Ihr zellulärer Anteil besteht aus Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) z.B. Dendritische Zellen, den T- und den B-Lymphozyten. Für die humorale adaptive Immunität sind die aus dem



Knochenmark stammenden B-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Antikörper zuständig. Sie dient dem Schutz vor extrazellulären Erregern. Die zelluläre adaptive Immunantwort, ausgeführt von aus dem Thymus stammenden, T-Lymphozyten ist für die Bekämpfung von intrazellulären Mikroorganismen verantwortlich. Dendritische Zellen initiieren und regulieren Immunantworten [7]. Sie stimulieren zum einen die NK-Zellen, die Initiatoren der angeborenen Immunantwort, ebenso wie die Effektor-Zellen der adaptiven Immunantwort: die B- und T-Lymphozyten, und stellen somit ein essentielles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar [7].

### 1.1.1 Monozyten und das Mononukleäre Phagozyten System

Das Mononukleäre Phagozyten System (MPS) ist ein spezialisiertes Gewebe zu dem Makrophagen, Dendritische Zellen, die Kupffer-Zellen in der Leber, die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Mikroglia des Gehirns sowie Osteoklasten gehören. Die Zellen des MPS erneuern sich ständig, zum einen durch die Proliferation von vom Knochenmark stammenden Vorläuferzellen im Gewebe, zum anderen durch die kontinuierliche Extravasation und Differenzierung von im Blut zirkulierenden Vorläuferzellen, den Monozyten. Monozyten gehören zu den mononukleären Leukozyten, die sich im Knochenmark aus Monoblasten entwickeln und als sich nicht mehr teilbare Zellen in die Blutbahn eintreten. Täglich verlässt etwa die Hälfte der zirkulierenden Monozyten die Blutbahn unter *Steady-state*-Verhältnissen und differenziert sich in gewebespezifische Makrophagen oder Dendritische Zellen [8].

Monozyten sind definiert als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes mit einem bohnenförmigen Zellkern, die CD11b, CD11c und CD14 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [8] und in der Blutbahn zirkulieren. Kommen sie dabei in Kontakt mit einer Entzündung, wandern sie in das betroffene Gewebe ein und differenzieren sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen. Besonders zahlreich kommen die Makrophagen im Bindegewebe, in der Submukosa des Verdauungstraktes, in Interstitium und Alveolen der Lunge, sowie in Leber und Milz, wo sie der Beseitigung alter Blutzellen dienen, vor. Die Aufgabe der Makrophagen ist es, körperfremde (Glyko)- Proteine auf Viren oder Bakterien zu erkennen und diese daraufhin „aufzufressen“. Das Erkennen der Antigene erfolgt mittels Oberflächenrezeptoren, einer von ihnen ist das auf Monozyten und Makrophagen vorkommende CD14, welches an Lipopolysaccharide auf gramnegativen Bakterien bindet [9]. Werden die Makrophagen durch die Bindung eines Antigens stimuliert, kommt es zur Aktivierung einer membranassoziierten NADPH-Oxidase, ein Enzymkomplex, der die Reduktion

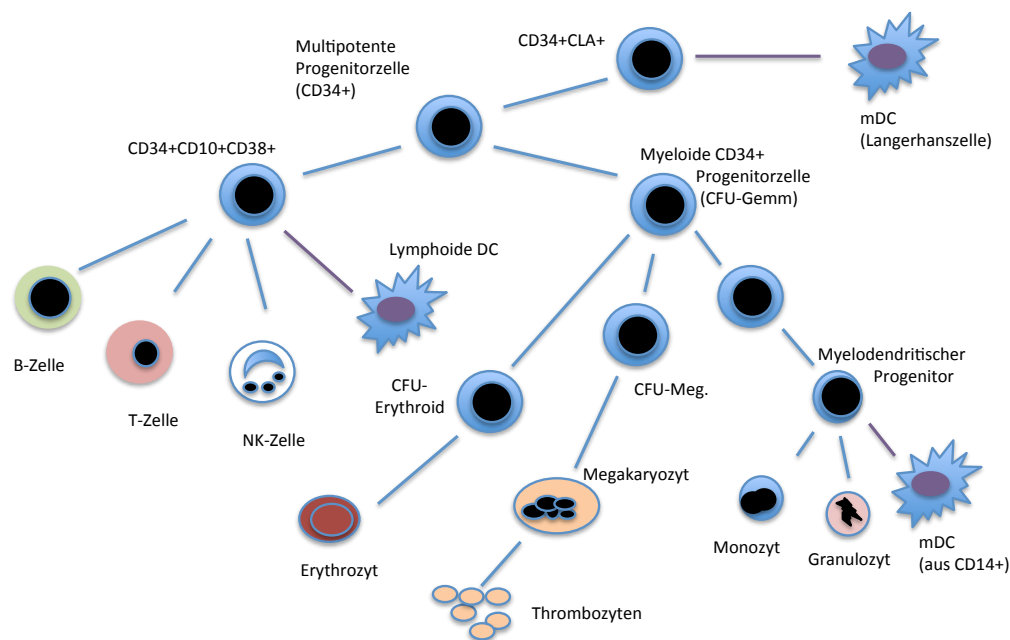
von molekularem Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^-$ ) katalysiert, welches von der Superoxid-Dismutase in  $H_2O_2$  umgewandelt wird [10]. Beide Metaboliten sind für Bakterien direkt toxisch. Bestandteile des phagozytierten Erregers werden auf die Zelloberfläche transportiert und an MHC-II Moleküle gebunden. Durch diese Antigenpräsentation werden die T-Lymphozyten der adaptiven Immunabwehr aktiviert. Die Monozyten spielen also eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems. Dies geschieht nicht nur durch die Antigenpräsentation, sondern auch durch die gleichzeitig stattfindende Sekretion von Interleukinen wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , die man früher als Monokine bezeichnete, sowie die Freisetzung von *colony-stimulating-factor* (CSF), *granulomonopoietic-enhancing-activity* (GM-EA) und Prostaglandin E (PGE) [11]. Die Zellpopulation der Monozyten ist sehr heterogen, ihre Subpopulationen unterscheiden sich in Morphologie und Funktion. Wang et al. [11] konnten zwei unterschiedliche Subpopulationen zeigen, die sich zum einen in der Größe und Expression von Oberflächenmolekülen, zum anderen auch in der phagozytotischen Aktivität und Zytokinproduktion unterscheiden [11].

Monozyten können nicht nur zu Makrophagen differenzieren, eine kleine aber bedeutende Minderheit von ihnen trägt die phagozytierten Partikel zu den Lymphknoten und differenziert sich währenddessen zu dendritischen Zellen [12].

### 1.1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen; sie befinden sich im peripheren Gewebe und „fangen“ dort Antigene. Sie entwickeln sich aus CD34+ Progenitorzellen [7] und sind kein einzelner Zelltyp, sondern ein Zellsystem das sich aus unterschiedlichen hämatopoetischen und aus dem Knochenmark stammenden Zelllinien entwickelt [1] (Abb. 1.1). Die DCs sind frei beweglich, sie akkumulieren sehr schnell am Ort der Antigendeposition [13]. Sobald sie ein Antigen aufgenommen haben, wandern sie über afferente Lymph- oder Blutbahnen zu den entsprechenden sekundären Lymphorganen [7]. Bei der Migration der dendritischen Zellen sind mehrere Mechanismen von Bedeutung, so können z.B. Langerhanszellen eine Typ IV Kollagenase freisetzen, die ihnen beim Durchbrechen der Basalmembran hilft [14]. Des Weiteren exprimieren DCs die humane Makrophagen-Elastase, durch welche zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix degradiert werden können [15]. Auf dem Weg zu den Lymphorganen werden die Antigene prozessiert und die unreifen Gewebs-DCs mit hoher endozytotischer und phagozytotischer Kapazität werden zu reifen dendritischen Zellen, mit einer hohen Expression von

Kostimulatormolekülen und damit ausgeprägten Fähigkeit zur Antigenpräsentation. In den Lymphorganen werden die Peptide naiven T- Zellen präsentiert – an der daraus entstehenden Immunantwort sind CD4+ TH1- Helfer Zellen ebenso wie zytotoxische CD8+ T- Zellen beteiligt [16], [7]. Durch die entstehenden Zell- und Zytokininteraktionen kommt es zur Aktivierung und Proliferation von, spezifisch gegen das präsentierte Antigen gerichteten, Effektorlymphozyten [1]. Die DCs erweisen sich deshalb als so gute antigenpräsentierende Zellen für die T-Zellen, weil sie zahlreiche Peptid-MHC-Komplexe für die Bindung an den TCR besitzen, diese Interaktion zwischen MHC-Komplex und TCR wird als sogenanntes Signal 1 bezeichnet. Außerdem weisen sie eine große Anzahl an Adhäsionsmolekülen und vielfältige Kostimulatormoleküle auf (Signal 2), und produzieren Chemokine. Dabei sind vor allem die Oberflächenstrukturen der B7-Familie (CD80/86) wichtig für die Regulation der T-Zell-Antwort [17].



**Abb.1.1:** Es gibt mindestens drei verschiedene Entstehungspfade der dendritischen Zellen aus CD34+ Progenitorzellen. Differenzierung der lymphoiden dendritischen Zellen aus CD34+CD10+CD38+ Zellen, Entstehung von Langerhans DCs aus CD34+CLA+ Progenitorzellen sowie die der myeloiden DCs aus DC14+ multipotenten myeloiden Progenitorzellen. Modifiziert nach[1].

DCs werden durch proinflammatorische Stimuli wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und LPS zur Reifung und zur vermehrten Oberflächenexpression von Adhäsions- und Kostimulatormolekülen angeregt. Cella et al. [18] zeigten in ihrer Arbeit, dass jedoch die stärkste Stimulation für die Oberflächenexpression von ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule*), CD80 und CD86 durch die Bindung von CD40 an CD40L erfolgt. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Kapazität der DCs, die Proliferation sowie die INF- $\gamma$  Produktion von T-Zellen zu triggern. Des Weiteren führt diese Bindung zur Produktion von großen Mengen IL-12 durch die dendritischen Zellen. Auch TNF- $\alpha$  und LPS stimulieren die IL-12 Produktion der dendritischen Zellen, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß. Da über IL-12 bekannt ist, dass es für die Entwicklung einer Th1-Immunantwort verantwortlich ist, kommen Cella et al.[18] zu dem Schluss, dass die T-Zellen über die CD40-CD40L Bindung, die antigenpräsentierende Funktion der DCs modulieren können und es bevorzugt zu einer Th1-Antwort kommt [18]. Damit sind die DCs nicht nur verantwortlich für die Induktion der primären Immunantwort, sondern spielen auch eine Rolle bei der Entscheidung über die Art der T-Zellantwort sowie bei der Entstehung von Immuntoleranz [7], [19].

Die dendritischen Zellen lassen sich in mindestens zwei verschiedene Zelllinien unterteilen: die myeloiden dendritischen Zellen (mDC) die noch weiter in mDC-1 und mDC-2 unterteilt werden, stammen von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab, sind HLA-DR+/DC11c+ und negativ für lymphoide sowie myeloide Oberflächenmarker. Sie rufen eine ausgeprägte Antwort von naiven T-Zellen hervor und sind wichtige Produzenten von IL-12. Die zweite Zelllinie ist die der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC). Die pDC stammen von Progenitorzellen aus dem Thymus und aus den T-Zell-Zonen der sekundären Lymphorgane ab und entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-3. Sie sind CD11c-/HLA-DR+/CD123+, stimulieren naive T-Zellen dazu, Th2- spezifische Zytokine zu produzieren, können Apoptose induzieren und potentiell selbstreaktive T-Zellen eliminieren. Des Weiteren werden sie als Hauptproduzenten von INF- $\alpha$  nach viraler Infektion beschrieben [20], [1].

### 1.1.3 Cluster of differentiation

Seit 1984 haben es sich die *Human Leucocyte Differentiation Antigens Workshops* (HLDA) zur Aufgabe gemacht, die Oberflächenmoleküle auf Leukozyten zu untersuchen und zu charakterisieren. 2004 wurde der Name der Organisation in

*Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM) umbenannt [21]. *Cluster of differentiation* (CD) sind Zell- Oberflächenmoleküle, die man sich für die Identifikation von Immunzellen zu Nutze gemacht hat. Die CD Moleküle können unterschiedliche Funktionen erfüllen, häufig dienen sie als Rezeptoren oder Liganden.

CD40 ist ein 50-kD großes Kostimulatormolekül auf antigenpräsentierenden Zellen (APC). Als Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie wurde es zuerst auf Tumor- und B-Zellen identifiziert [22]. Die Expression auf der Oberfläche von Monozyten kann mittels Interleukin 3, Interferon- $\gamma$  oder colony-stimulating factor (GM-CSF) verstärkt werden [23]. CD-40 spielt eine Schlüsselrolle bei Wachstum und Differenzierung der B-Zellen sowie der Monozytenaktivierung. Dabei ist die Interaktion zwischen CD40 und dem CD40 Rezeptor (CD40L) essentiell [22]. Dies wird auch bei Patienten deutlich, die an einem Hyper-IgM-Syndrom, einer X-chromosomal vererbten Veränderung des CD40L-Gens leiden, die zu einem Mangel an IgG und IgA führt [24]. Kommt es zur Aktivierung von CD-40 auf Langerhanszellen lassen sich folgende wichtige morphologische Veränderungen beobachten: die Reduktion des Zytoplasmagehaltes in der Zelle, eine verstärkte Entwicklung von Dendriten sowie eine Veränderung des Phänotyps: MHC-II wird auf einem hohen Level auf der Oberfläche der Zelle exprimiert, es findet eine Hochregulation von CD58, CD80 und CD86 statt. Eine Aktivierung von CD40 auf Langerhanszellen führt zudem zur Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-8 und *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ), während die gleiche Aktivierung auf Monozyten die Sekretion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  induziert [22].

CD80 und CD86 gehören beide zur Immunglobulin-Supergen-Familie, sie werden auf unterschiedlichen Genen exprimiert [25] und sind monomere transmembrane Glycoproteine [26]. Sie sind als Ko-Stimulatormoleküle neben der Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) zur optimalen Aktivierung von T-Zellen notwendig [27]. CD80 und CD86 binden an dieselben Rezeptoren (CD28 und CTLA-4), aber nur ca. 25% ihrer Sequenz sind identisch [26]. Daher unterscheiden sich ihr Mechanismus und ihre Kinetik beim Binden an CD28 und CTLA-4; die Inhibierung einer CD80 getriggerten Zellantwort benötigt eine 100fach niedrigere CTLA-4Ig-Konzentration, der CD80-CTLA-4Ig-Komplex dissoziierte 5-8fach langsamer. CD86 wird außerdem zu einem früheren Zeitpunkt der Immunantwort exprimiert [25], [28]. Während CTLA-4 nur auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und eine Bindung von CD80 bzw. CD86 zu einer Reduzierung der T-Zell-Aktivität führt, befindet sich CD28 auf allen T-Zellen. CD28 ist ein potenter Ko-Stimulator für die Zytokinproduktion,

seine Aktivierung führt zu einer Stabilisierung der mRNA von einigen Zytokin-Genen und nimmt somit Einfluss auf die Regulation der Transkription von diesen [26].

HLA-DR ist ein MHC II Zelloberflächenrezeptor, der für die antigenpräsentierende Funktion von Makrophagen und anderen APC benötigt wird. An ihm können Peptide gebunden und dem TCR auf T-Helferzellen präsentiert werden; dadurch kommt es zur Bindung des TCR an HLA-DR. Die Expression des HLA-DR Antigens ist essentiell für die Interaktion zwischen Monozyten bzw. Makrophagen und den T-Zellen und kann durch INF stimuliert werden [29].

#### **1.1.4 Zytokine**

Zytokine, oder auch Interleukine genannt, sind lösliche Faktoren, die die Immunantwort regulieren. Zu Beginn ihrer Erforschung, ging man davon aus, dass ihre Funktion spezifisch ist, sie z.B. nur auf bestimmte Zellen des Immunsystems wirken. Später hat man herausgefunden, dass die meisten Zytokine multifunktionell sind und mehrere Zytokine auch auf dieselben Zellen einwirken und sich in ihrem Effekt ergänzen oder verstärken können. Darüberhinaus stellte man fest, dass sie nicht nur von immunkompetenten Zellen, sondern von zahlreichen Geweben oder Zellen, wie Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen oder Astrozyten im Gehirn hergestellt werden können [30].

Ein typisches Beispiel für multifunktionelle Zytokine sind IL-1, IL-6 und TNF, die hauptsächlich von Monozyten produziert werden und zahlreiche biologische Funktionen aufweisen (Tab. 1.1). Sie regulieren die Immunantwort, Hämatopoese und Entzündungsreaktion. Eine der Hauptfunktionen von IL-6 ist die Induktion der Antikörperproduktion [30]. IL-1 ist ein endogenes Pyrogen und das potenteste inflammatorische Zytokin [31], während TNF als Endotoxin-induzierender Faktor, in bestimmten Tumoren in vivo eine hämorrhagische Nekrose verursacht und damit tumorizid wirkt [32]. Die Zytokine können sich gegenseitig beeinflussen, IL-1 und TNF induzieren die Produktion von IL-6, während IL-6 die TNF-Expression reguliert [30].

	<b>IL-1<math>\alpha</math> und IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>
Produzenten	Makrophagen, Keratinozyten, Endothelzellen, T- Zellen, B-Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Fibroblasten	Makrophagen, T-Zellen, B- Zellen, Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Astrozyten, Mesangialzellen, Knochenmarkstromazellen	Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen
Biologische Aktivität	Induktion von: - PGE <sub>2</sub> Synthese - Fibroblasten- Wachstum - Knochenresorption - ICAM-1 Expression - Fieber - Schlaf - Anorexie - Synthese von Kollagenase - Wachstum und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten	Induktion von: - B-Zell Differenzierung - Plasmazytom-Wachstum - Synthese von Akute Phase Protein - T-Zell Aktivierung und Differenzierung - Makrophagen- differenzierung - Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen - Reifung von Megakaryozyten - Neuralzelldifferenzierung - Mesangialzell-Wachstum	Tumorzide Aktivität  Inhibierung der Lipoproteinlipase  Induktion von: - Knochenresorption - Differenzierung von myeloiden Leukozyten - Prokoagulatorische Aktivität - Wachstum und differenzierung von B Zellen - ICAM-1 Expression

**Tab. 1.1: Eigenschaften von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , modifiziert nach [30]**

Interleukin 12 spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen intrazelluläre Infektionen, vor allem solche die von intrazellulären Bakterien hervorgerufen werden. Es wird von APCs produziert und stellt ein Verbindungsglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort dar, indem es die Differenzierung von antigenspezifischen TH1-Helferzellen induziert [33]. Die aktivierten T-Zellen (sowie NK-Zellen) setzen INF frei, welches zur Aktivierung von Makrophagen führt, den wichtigsten Effektorzellen gegen intrazelluläre Infektionen [34].

IL-18 besitzt viele funktionelle Gemeinsamkeiten mit IL-12. Es wurde zunächst als ein von Kupferzellen produziertes Kostimulator-molekül für die INF Produktion beschrieben und in der Tat ergänzen sich die beiden Interleukine in ihrer Wirkung auf die INF Produktion von humanen sowie Mäuse- T-Zellen [35]. Die Stimulation der TH1-Zellproliferation, sowie der INF Produktion konnte aber auch unabhängig von IL-12 nachgewiesen werden [36]. Zudem stellte sich heraus, dass IL-18 ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist, das durch direkte Stimulation der Genexpression und Synthese von TNF- $\alpha$  in CD3+/CD4+ und NK-Zellen, die Produktion von IL-1 $\beta$  und IL-8 durch CD14+ Zellen im peripheren Blut hervorruft [37].

## 1.2. Extrakorporale Photopherese (ECP)

Das erste Mal, dass man UV-A Bestrahlung in Kombination mit 8-Methoxypsoralen verwendete war 1970, ursprünglich als Therapieversuch bei Psoriasis [38], allerdings kombinierte man dabei oral appliziertes Psoralen mit UV-A Bestrahlung der Haut. Dieses Verfahren wird als PUVA (Psoralen plus UV-A) bezeichnet. 1985 wurde die erste Studie zur Wirkung der extrakorporalen Photopherese beim *cutaneous T-cell-lymphoma* (CTCL) durchgeführt und 1987 von Edelson [39] veröffentlicht. Diese Publikation zeigte, dass die ECP bei einigen Patienten zur vollständigen Remission des CTCL und bei anderen zur Reduktion des Tumors führte. In *follow-up* Studien dieser Patienten konnte eine erhöhte Überlebenszeit im Vergleich zu historischen Kontrollen gezeigt werden [40]. Ein Jahr später wurde die ECP zur Behandlung des CTCL zugelassen. Heute ist die Extrakorporale Photopherese eine etablierte und effektive Therapie für die Behandlung von bestimmten Formen des fortgeschrittenen T-Zell Lymphoms. Darüber hinaus zeigt sie eine viel versprechende Wirkung bei der Behandlung von Graft-versus-host-disease (GVHD), Prävention und Behandlung von Abstoßungsreaktionen solider Organtransplantate und auch bei Morbus Crohn. Durch die zusätzliche Durchführung der ECP ist bei einigen dieser Erkrankungen außerdem die Reduktion von systemischen Steroiden und anderen Immunsuppressiva möglich und somit auch die Reduzierung von deren Nebenwirkungen. Ein weiterer entscheidender Vorteil der ECP ist, dass sie von den Patienten sehr gut toleriert wird und keine schwerwiegenden klinischen Nebenwirkungen hervorruft [41].

### 1.2.1 Prinzip der Extrakorporalen Photopherese (ECP)

Bei der extrakorporalen Photopherese wird dem Patienten Blut entnommen und durch Leukopherese die weißen von den roten Blutkörperchen getrennt, wobei die Erythrozyten dem Patienten sofort wieder zurückgegeben werden. Die Leukozyten werden mit 8-Methoxypsoralen behandelt, anschließend einer Bestrahlung mit UVA Licht ausgesetzt und dem Patienten die, auf diese Weise photoaktivierten Zellen, wieder zurück transfundiert [41].

Dabei wurde für das UVB Licht mit einer Wellenlänge von 280-320 nm die größte immunsuppressive Wirkung nachgewiesen, es wird sehr stark von der DNA und anderen Molekülen absorbiert, und ist dadurch gleichzeitig auch sehr schädigend für diese [42]. Aufgrund dessen verwendet man ausschließlich UV-A Strahlung (320-400



nm), sie zerstört weitaus weniger DNA, durch ihre geringere Energie hat sie nur in Verbindung mit sogenannten „sensitizern“ eine direkte Wirkung auf die Zellen [42]. Als *sensitizer* benutzt man 8-Methoxypsoralen (8-MOP), ein Medikament, dass die DNA empfänglicher für die UV-Strahlung macht. Ursprünglich wurde es als Pflanzenextrakt aus der Psoraleapflanze (*Ammi majus*) gewonnen, deren potentielle Heilkraft schon von den Ägyptern in der Antike erkannt worden war [43]. 1947 konnte 8-MOP erstmals als aktive Komponente aus der *Ammi majus* isoliert werden [43]. Das kleine 8-MOP Molekül dringt schnell in die Zelle und deren Zellkern ein, aktiviert wird es allerdings erst durch die UV-A Strahlung; dann wird es zu einem hochreaktiven Molekül, das kovalente Bindungen mit den Pyrimidinbasen der DNA eingehen kann, sich in die DNA einlagert und *crosslinks* zwischen den DNA- Strängen formen kann. Sobald die Strahlung beendet wird kehrt 8-MOP wieder in seinen inaktiven, inerten Zustand zurück [44], [45]. Schafft das Reparatursystem des Zellkerns es nicht mehr die entstandenen DNA- Schäden zu beheben, wird von der Zelle der programmierte Zelltod- die Apoptose eingeleitet. Dies ließ sich in einer Studie von Yoo et al. [46] bestätigen, in der die stattgefundene Apoptose mittels Fluoreszenz- und Elektronenmikroskop, sowie Gelelektrophorese gezeigt wurde. Es kam zum Verlust des Zellvolumens und einem gleichzeitigen Anstieg der Dichte der Zelle, in der Gelelektrophorese zeigten sich die charakteristischen DNA- Strangbrüche. Des Weiteren wurde klar, dass mit 8-MOP alleine keine Apoptose, mit einer alleinigen Bestrahlung von UV-A in einer Dosis  $\geq 2\text{J/ cm}^2$  sehr wohl eine Apoptose der Lymphozyten ausgelöst werden konnte [46]. Die Apoptoseinduktion scheint eine sehr wichtige Rolle bei der Wirksamkeit der Therapie zu spielen, tatsächlich ordnet man die Wirkung vieler Chemotherapeutika unter anderem der Apoptoseeinleitung in der malignen Zellpopulation zu [47], [48], [49].

### 1.2.2 Entwicklung der ECP als Therapie des CTCL

Das kutane T-Zell Lymphom (CTCL) ist eine seltene lymphproliferative Erkrankung, die sich durch eine Ansammlung von malignen T-Zell Klonen in der Haut auszeichnet [50]. Die häufigste Form ist die Mycosis fungoides (MF) die ca. 60% des CTCL ausmacht [50], wesentlich seltener (ca. 5%) ist das Sezary Syndrom mit einer deutlich schlechteren Prognose und einer mittleren Überlebenszeit von weniger als 3 Jahren nach Erstdiagnose [51]. Ursprünglich wurde die ECP mit oral gegebenem 8-Methoxypsoralen und UV-A Bestrahlung der Haut durchgeführt [50]. Das hatte zur Folge, dass die Therapie nur in frühen, auf die Haut lokalisierten, Stadien der CTCL

effektiv war. Zudem zeigten sich bei oraler Aufnahme des 8-MOP erhebliche Nebenwirkungen: Übelkeit, Erbrechen und damit teilweise eine unvollständige gastrointestinale Absorption und schwankende Plasmaspiegel des Medikaments [41]. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen waren die Langzeitkomplikation durch die UV-Bestrahlung der Haut mit erhöhter Photosensitivität und dem erhöhten Potential für die Entstehung anderer maligner Hauterkrankungen [39]. Zur Vermeidung dieser Langzeitkomplikationen ging man in der weiteren Entwicklung der ECP dazu über, nicht direkt die Haut, sondern isolierte Leukozyten zu bestrahlen, die dem Patienten anschließend wieder rücktransfundiert wurden [52]. Die 8-MOP Gabe erfolgte oral vor der Leukopherese, doch damit bestanden weiterhin die gastrointestinalen Nebenwirkungen des Psoralen und ebenso die unterschiedlichen MOP-Konzentrationen durch die individuelle Pharmakokinetik der Patienten. 1992 wurde 8-MOP erstmals direkt zu den isolierten Zellen gegeben was dazu führte, dass keine der typischen Nebenwirkungen mehr auftrat und durch die konstanten Medikamentenspiegel keine Plasmaspiegelkontrollen mehr durchgeführt werden mussten [41], [52]. Heute ist die ECP eine gut etablierte Therapie für CTCL: eine Metaanalyse von 19 Studien mit Patienten in allen CTCL Stadien zeigt eine kombinierte Antwortrate von 55,5% bei ECP als Monotherapie und 55,7% als Kombinationstherapie [53]. Als *complete responders* galten 14,8% bzw. 17,6% [53]. Auch beim Sezary Syndrom zeigte sich eine gute Wirksamkeit [41]. In den Empfehlungen zur Behandlung von Mycosis fungoides und Sezary Syndrom der *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* wurde die ECP als *first line* Therapie für Patienten mit MF Stadium III und Sezary Syndrom empfohlen [50]. Sie kann entweder als Monotherapie oder als Kombinationstherapie z.B. mit Interferon- $\alpha$ -2b [54], Bexarotene (ein orales Retinoid) [55], Sargramostim (einem granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [56] oder Interferon- $\gamma$  angewendet werden [57], [58].

### 1.2.3 ECP bei Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen bleibt weiterhin ein bedeutender kurativer Therapieansatz für viele maligne und nicht-maligne Erkrankungen [58]. Die Graft-versus-Host-Disease ist immer noch das größte Problem der Therapie, die man mit der Gabe von Immunsuppressiva, allen voran den Kortikosteroiden zu verhindern versucht [59]. Kortikosteroide sind die effektivste Therapie bei GvHD, aber die erheblichen Nebenwirkungen, vor allem auch die

Langzeitnebenwirkungen schränken ihren Gebrauch ein. Auch die übrigen Immunsuppressiva, z.B. Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin und Tacrolimus sind toxisch für Niere, Leber und Nervensystem. Darüber hinaus führt eine Immunsuppression auch zur Suppression der vom Spender stammenden T-Zellen und verhindert somit den graft-versus-tumor Effekt der Stammzellspende [44]. Neben den weitaus geringeren Nebenwirkungen bei der ECP ist ein weiterer wichtiger Vorteil, dass es dabei zu einer selektiven Unterdrückung der GvHD kommt, ohne erhöhte Infektionsgefahr oder der Gefahr des Wiederausbruches von malignen Erkrankungen. Bei den Patienten, die gut auf die ECP ansprechen, kann oftmals die Dosis der Immunsuppressiva reduziert, oder diese sogar ganz abgesetzt werden [44], [60], [61]. In seiner klinischen Studie über die Wirksamkeit von ECP bei akuter GvHD von 2000 führt Greinix [62] bei 21 Patienten (Median 38 Jahre alt) die nach Stammzelltransplantation eine steroid-refraktäre akute GvHD Grad II-IV entwickelt haben, eine ECP durch. Drei Monate nach Beginn der ECP kam es bei 60% der behandelten Patienten zur vollständigen Remission der GvHD, die Wirksamkeit der Therapie war abhängig vom Schweregrad der GvHD, sowie von der Organbeteiligung: ein sehr gutes Ansprechen wurde bei reiner Hautbeteiligung, sowie Leberbeteiligung beobachtet, jedoch nicht bei Beteiligung des Gastrointestinaltraktes. Nach einer mittleren Beobachtungszeit von 25 Monaten nach Stammzelltransplantation lebten noch 57% der behandelten Patienten. Die Vier-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit war bei den vollständigen Remissionen 91%, im Gegensatz zu 11% bei den unvollständigen [62]. Anhand der heutigen Studienlage wird die ECP bisher nur bei steroidrefraktärer GvHD empfohlen [44].

Bei der chronischen GvHD wurden die besten Ergebnisse ebenfalls beim GvHD der Haut, der Schleimhäute und der Leber beobachtet. Von Patienten mit anderen Manifestationen wie Lungen GvHD, neuromuskulärer Beteiligung oder Thrombozytopenie gibt es nur sehr wenige Daten, aber diese sind recht vielversprechend [63]. Besonders beeindruckend ist die erhebliche Verbesserung der Lebensqualität derer Patienten, die gut auf die Therapie ansprechen [44]. Es gibt keine genauen Parameter, mit denen sich eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens der ECP machen lässt [63], allerdings hat sich herausgestellt, dass die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn mit der Therapie so früh wie möglich begonnen wurde, noch bevor es zu schweren Schädigungen des Gewebes kam [44], [60],[61].

### 1.2.4 Wirkmechanismus der ECP

Um Patienten mit CTCL, Graft-versus-host-disease, Transplantatabstoßung und Autoimmunerkrankungen identifizieren zu können, die vermutlich gut empfänglich für die ECP sind, hat man im Laufe der Zeit die folgenden Charakteristika aufgestellt: von Vorteil für die Wirksamkeit ist neben einer kurzen Krankheitsdauer von weniger als 2 Jahren, der Abwesenheit von massiver Lymphknotenbeteiligung oder erheblicher Beteiligung innerer Organe und einer Leukozyten Zahl unter  $20.000/\text{mm}^3$ , eine möglichst geringe Zahl von Sezary Zellen, eine möglichst normale Aktivität der natürlichen Killerzellen, eine normale Anzahl von zytotoxischen T-Lymphozyten, keine vorhergegangene intensive Chemotherapie und eine Hautbeteiligung von  $< 10\text{-}15\%$  der Körperoberfläche. All diese Kriterien sind nicht absolut aber sie machen deutlich, dass zu einer effektiven Therapieantwort ein möglichst gut funktionierendes Immunsystem notwendig ist, welches in der Lage ist auf die malignen mit Photopherese behandelten Zellen zu antworten. [64].

Früher nahm man an, die Effektivität der ECP würde ausschließlich von den verursachten DNA Schäden und der dadurch eingeleiteten Apoptose der Lymphozyten abhängen [65]. Da aber während eines Behandlungszyklus nur 5-10% aller Lymphozyten der Behandlung ausgesetzt sind und die CTCL eine Erkrankung ist, bei der die malignen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen bevorzugt die Haut befallen und deshalb nur ein äußerst geringer Anteil dieser Zellen überhaupt von der Therapie betroffen ist, schien die Zerstörung der malignen T-Zellen nicht die alleinige Erklärung ihrer Wirksamkeit zu sein [44]. Es wurde vermutet, dass die Wirkung der ECP durch eine spezifische anti-T-Zell Reaktion durch das Immunsystem mit bewirkt wird. Diese Vermutung wurde von Untersuchungsergebnissen unterstützt, die zeigten, dass die ECP die  $\text{TNF-}\alpha$  Produktion von Monozyten induziert [66].  $\text{TNF-}\alpha$  könnte beim CTCL zahlreiche anti-Tumor Effekte hervorrufen, bei der systemischen Sklerose könnte es eine Erklärung für die Unterdrückung der Kollagensynthese und die Induktion der Kollagenaseproduktion sein [66].

Man stellte daraufhin die Hypothese auf, dass apoptotische Lymphozyten, die durch ECP entstehen ihre Expression von tumorassoziierten Antigenen erhöhen, welche zur Aktivierung von Monozyten sowie der Reifung von dendritischen Zellen zu Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) führen [67]. Die aktivierten dendritischen Zellen phagozytieren die apoptotischen CTCL- Zellen, bauen sie ab, präsentieren die CTCL-Antigene den zytotoxischen T-Zellen und führen damit zu einer Suppression des CTCL

durch Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen den malignen T-Zell Klon [68].

### **1.2.5 ECP-selektive Immunkontrolle ohne generalisierte Immunsuppression?**

1988 wurde die ECP von der FDA (Food and Drug Administration) in den USA als erste selektive Immuntherapie bei Tumoren zugelassen [44]. Um nachzuweisen, dass die Immunsupprimierung durch ECP spezifisch ist, führten Suchin et al. [69] bei Sklerodermie- Patienten, die monatlich eine Extrakorporale Photopherese Therapie erhielten, einige Untersuchungen der Immunabwehr durch. Sie untersuchten die verzögerte Immunreaktion durch Hauttests, die T-Zell Proliferation nach Impfungen mit Tetanus Toxin und die Serumantikörper- Titer gegen typische virale Pathogene. Es stellte sich heraus, dass sich nach 6 Monaten ECP die Antikörpertiter gegen Viren sowie die Immunantwort vom verzögerten Typ nicht signifikant von den Ausgangswerten der untersuchten Patienten unterschieden. Auch die T-Zell Antwort auf das Tetanus Toxin blieb für mindestens 6 Monate nach der Impfung normal. Diese Ergebnisse lassen im Zusammenhang mit unter 1.2.3 bereits erwähnten Beobachtungen, dass es unter ECP zu keinem erhöhten Auftreten von opportunistischen Infektionen oder Neoplasien kommt, darauf schließen, dass diese Therapie nicht komplett Immunsuppressiv wirkt und eine Immunantwort auf Impfungen oder Antigene durchaus noch möglich ist [69].

### **1.2.6 Die Impftheorie**

Die Hypothese der Impftheorie wurde entwickelt, um den systemischen Antitumoreffekt beim CTCL zu erklären. Es ist bekannt, dass die ECP Apoptose in den PBMC (peripheral blood mononuclear cells) induziert, anhand seiner Studie haben Yoo et al. [46] gezeigt, dass Patienten mit Sezary Syndrome die T-Zell Subpopulationen im Blut und ebenso der maligne Klon genauso empfänglich für diese Apoptoseinduktion sind. Im Gegensatz dazu schienen Monozyten nicht in Apoptose zu gehen, sondern egal ob behandelt oder nicht, die apoptotischen PBMC zu phagozytieren [46].

Berger et al. [70] zeigten in ihrer Arbeit, dass sich Monozyten, angeregt durch Photopherese zu Dendritischen Zellen ausdifferenzieren. Dieser Übergang ist daran erkennbar, dass sie das für Monozyten typische Oberflächenmolekül CD14 nicht mehr

exprimieren, sondern das für unreife DCs spezifische zytoplasmatische CD83 und membranständige CD36. Die differenzierten DCs phagozytierten die malignen T-Zellen und stimulierten darüber hinaus die gesunden Lymphozyten, eine erhöhte Anzahl von MHC II Molekülen zu exprimieren, an denen die tumorspezifischen Antigene präsentiert werden können. Dies bedeutet, dass die mit Tumorantigenen beladenen Zellen ohne Hinzufügen von exogenen Zytokinen und ohne besondere Manipulation oder Isolationentstanden sind. Berger bezeichnet dies als sogenannte Impfung der DCs, die auch für die Behandlung weiterer maligner Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte [70].

Diese Impfstheorie könnte auch die Wirksamkeit der ECP bei Autoimmunerkrankungen erklären. Bei autoimmunen Erkrankungen kann es zur oligoklonalen Expansion von Immun Effektor Zellen kommen, die dann Gewebeschädigungen hervorrufen. Wenn diese expandierten Populationen durch die ECP dezimiert werden, kann die Krankheit unter Kontrolle gebracht werden [44]. Ein weiteres Argument welches für die Theorie spricht, ist dass man auch in Patienten mit chronischer GvHD, bei denen die ECP gut gewirkt hat, klonale Populationen von reaktiven T-Zellen gefunden hat, im Gegensatz zu Patienten, bei denen die Therapie nicht angesprochen hat [71].

### 1.2.7 Induktion von regulatorischen T-Zellen

Seit der Charakterisierung der regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) versteht man viel besser, wie Immunantworten im menschlichen Körper kontrolliert werden.  $T_{reg}$  bestehen aus einer heterogenen Gruppe von T-Lymphozyten, die aktiv Immunantworten verhindern. Man hat erkannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Vorbeugung von Autoimmunerkrankungen, GvHD und Transplantatabstoßungen spielen [72].

Die Immuntoleranz ist zum einen abhängig von der Ausselektion der Immunzellen im Thymus, die gegen den eigenen Körper gerichtet sind (d.h. zentrale Toleranz) und zum anderen von den regulatorischen T-Zellen, die sich gegen die Zellen richten, die der Selektion im Thymus entgangen sind (d.h. periphere Toleranz). Beim Erwachsenen ist die zentrale Toleranz durch die Rückbildung des Thymus verloren gegangen und die Bedeutung der peripheren Toleranz wird deshalb um so wichtiger vor allem nach Stammzelltransplantation, wenn eine Reaktion gegen die Spenderzellen verhindert werden soll [44]. Die CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz [73]: sie vermindern die Immunantwort auf körpereigene, aber auch körperfremde Antigene, und zwar ohne

antigenspezifisch zu sein; schaltet man nun die CD4+CD25+ Zellen aus, z.B. im Mausmodell, so wird diese Suppression ebenfalls ausgeschaltet [72], es kommt zur verstärkten Immunantwort, nicht nur gegen körperfremde Antigene, sondern auch körpereigene. Störungen im Mechanismus der regulatorischen T-Zellen können mögliche Ursachen für Autoimmunerkrankungen sein [73].

Bei der allogenen Stammzelltransplantation inhibieren die vom Spender stammenden regulatorischen T-Zellen die GvHD. An Mäusen mit Leukämie und Lymphom wurde gezeigt, dass die regulatorischen T-Zellen die frühe Expansion von alloreaktiven T-Zellen unterdrücken, ebenso wie die Ausbildung ihrer IL-2-Rezeptor  $\alpha$ -Kette und damit ihre Fähigkeit, GvHD auszulösen, ohne den GVT- Effekt zu beeinträchtigen [74]. Ebenfalls am Mausmodell wurde von Maeda et al. [72] gezeigt, dass der selektive immunmodulatorische Effekt der ECP durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen hervorgerufen wird, die CD4+CD25+ Zellen konnten hypersensitive Kontaktreaktionen unterdrücken, diese Suppression verschwand, sobald die regulatorischen T-Zellen entfernt wurden [72]. Patienten mit chronischem GvHD haben eine höhere Konzentration von CD4+CD25+ Zellen als die ohne GvHD, beim Rückgang der Erkrankung, sinkt die Anzahl wieder [75]. Bei der konventionellen medikamentösen Immunsuppression kommt es auch zur Unterdrückung der  $T_{reg}$  [76], was eine Erklärung dafür sein könnte, dass es unter Immunsuppressiva zu keiner Toleranzentwicklung gegenüber dem Transplantat kommt. Der Signalweg über den die regulatorischen T-Zellen stimuliert werden, ist jedoch noch unbekannt. [44].

### 1.2.8 Modulation der Zytokinproduktion

Lösliche Faktoren sind von zentraler Bedeutung für Kommunikation und Signaltransduktion zwischen Zellen und Gewebe. Deshalb ist es auch bei der ECP äußerst interessant zu untersuchen wie die Zytokinproduktion der behandelten Zellen beeinflusst wird. Tokura et al. [77] untersuchten die Zytokinproduktion von mit Photopherese behandelten Keratinozyten, Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen. Die Produktion der meisten Zytokine wird durch die ECP wie erwartet herabreguliert, was den Untergang der Zellen reflektiert. Allerdings stimulierte eine Behandlung mit 8-MOP und UVA in niedrigen Bestrahlungsdosen die T-Lymphozyten zur Produktion von IL-2 und INF- $\gamma$  (spezifisch für  $T_H1$ -Helferzellen), während die Produktion von IL-4 und IL-10 (spezifisch für  $T_H2$ -Helferzellen) supprimiert wurde. Schon zuvor wurde anhand von mit ECP behandelten malignen T-Zellen von CTCL Patienten, die anfangen INF- $\gamma$  zu produzieren, gezeigt, dass die ECP einen T-

Lymphozyten- *shift* von Th2- zu Th1-Zellen hervorruft. Di Renzo et al.[78] fanden heraus, dass Patienten mit CTCL eine größere Menge an IL-4 aber eine geringere Menge an IFN- $\gamma$  und IL12 als in der Kontrollgruppe von gesunden Probanden herstellten, dieses Verhältnis normalisierte sich nach einem Jahr ECP und ließ sich dann nicht mehr von der Kontrollgruppe unterscheiden. Bei CTCL Patienten besteht also ein Missverhältnis der Th1- /Th2- Helferzellen Relation, dieses Missverhältnis wird durch die ECP umgekehrt. Dies könnte auch ein Teil der Erklärung für die therapeutische Wirksamkeit der ECP sein, denn man nimmt an, dass die Mehrheit der malignen T-Zellen beim CTCL Th2- Helferzellen sind [77].



## 2. Fragestellung der Arbeit

Die extrakorporale Photopherese ist eine etablierte und effektive Therapie für die Behandlung des fortgeschrittenen T-Zell Lymphoms und für weitere vielfältige hämatologische Erkrankungen die durch Expansion von pathologischen T- Zellklonen entstehen, wie Graft-versus-host-disease, Transplantatabstoßung und Autoimmunerkrankungen [79]. Doch trotz der erfolgreichen Anwendung dieser Therapie in der Praxis und zahlreicher Veröffentlichungen über ihre Wirkungsweise bei den doch heterogenen Erkrankungen, sowie den zahlreichen Untersuchungen auf zellulärer Ebene, bleiben noch viele Fragen offen.

Um die Grundeinstellungen für die Photopheresebehandlung von PBMC festzulegen, untersuchten wir zunächst die Induktion der Apoptose mittels Durchflusszytometrie. Zur Validierung der ECP führten wir, wie in der Literatur vorgeschlagen [79], eine Qualitätskontrolle der Behandlung durch, indem wir ihren antiproliferativen Effektes untersuchten. Des Weiteren überprüften wir den Einfluss der ECP auf die Kostimulatormoleküle auf Monozyten, den Einfluss auf die Zytokinproduktion von behandelten PBMC sowie Monozyten und wie sich die unterschiedlichen Zellpopulationen nach der extrakorporalen Photopherese verhalten.

Unser Ziel war es, immunomodulatorische Zytokine zu identifizieren, deren Produktion durch die extrakorporale Photopherese signifikant geändert wird und ihren Einfluss auf die klinische Wirksamkeit der Therapie zu prüfen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Geräte

Autoklav Systec 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg, D
AutoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, D
Brutschrank Hera Cell	Heraeus Instruments, Hanau, D
Dosimeter RM-21	Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur™ Becton Dickinson, Heidelberg, D FACSCanto™
ELISA Reader SLT Spectra	SLT LabInstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, D
ELISA Reader Sunrise	Tecan Austria GmbH, Austria
HydroFlex Elisa Washer	Tecan Austria GmbH, Austria
Inkubator HERAccl240	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
pH-Meter inoLab pH Level 1	WTW GmbH, Weilheim, D
Inversmikroskop	Zeiss, Göttingen, D
Durchlichtmikroskop	Leitz Biomed, Leica Microsystems, Wetzlar
Photophoresebestrahlungsgerät mit UVA- Licht	BIO-LINK® BLX
Sterilbank Hera safe	Heraeus Instruments, Hanau
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Waage METTLER PJ6000	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, D
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Billerica, USA
Millipore Elix® 5	
Zählkammer Neubauer Improved	0,0025mm²·0,1mm, Brand
Zentrifuge Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, D
Zentrifuge Hettich ROTIXA/AP	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge Hettich Universal 32	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge LABOFUGE <sup>GL</sup>	Heraeus CHRIST, Hanau, D

### 3.1.2 Zellmaterial

Die Leukozyten wurden aus Restblutmaterial (buffy coats) von Blutspendern nach Einverständnis und Zustimmung durch die Ethikkommission (AZ 05/00) isoliert.

### 3.1.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Albumin bovine (BSA)	SERVA, Heidelberg, D
Aqua ad iniectabilia	Baxter S.A., Lessines, B
CellFIX™ (10x)	BD Biosciences, Erembodegem, B
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DPBS (1x) ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Dulbecco's PBS(10x) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol absolute	Riedel-deHaën®, Sigma-Aldrich, Seelze, D
Ethanol 70 %	Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken, D
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Uppsala, S
Foetal Bovine Serum Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt, D
$\text{NaHCO}_3$	Merck, Darmstadt, D
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck, Darmstadt, D
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Coating-Buffer für ELISA (BD Biosciences Pharmingen):	100 mM $\text{NaHCO}_3$ 33,6 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in Milli-Q-Wasser (Millipore, Billerica, USA) pH 9,4-9,5
PBS/EDTA/BSA-Puffer:	1 x PBS 2 mM EDTA 0,5 % (w/v) BSA 0,2 µm filtriert
PBS/EDTA-Puffer:	1 x PBS 2 mM EDTA 0,2 µm filtriert

## Waschpuffer für ELISA

(BD Biosciences Pharmingen): 10 % Dulbecco's PBS (10x)  
 0,05 % (v/v) Tween 20  
 in Milli-Q-Wasser (Millipore)

**3.1.4. Kulturmedien**

## DC-Kulturmedium:

RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
NEM Natriumpyruvat, 1mM	Gibco™, Invitrogen Co, Auckland, Neuseeland
HEPES, 10mM	Gibco™, Invitrogen Co, Auckland, Neuseeland
FCS-Gold, hitzeinaktiviert, 10%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze

**3.1.5. Stimulantien/ Inhibitoren**

8-Methoxypsoralen 0,002%	Apotheke der Universitätsklinik Gießen, D
Caspase inhibitor set	Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, USA
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
R848 (Imidazoquinoline)	Invivo Gen, San Diego, USA

**3.1.6 Antikörper**

Purified Mouse Anti-Human CD3	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ, Klon HIT3a	
Anti-human monoclonal CD28	BD Pharmingen™, Heidelberg, D
Mouse IgG <sub>1</sub> , κ, Klon CD28.2	
APC Mouse Anti-Human CD11C	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG <sub>1</sub> , κ, Klon B-ly6	
APC Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ, Klon M5E2	
FITC Mouse Anti-Human CD14	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG <sub>2a</sub> , κ, Klon M5E2	
human CD1c (BDCA-1) APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG <sub>2a</sub> , Klon AD5-8E7	
human CD19 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG <sub>1</sub> , Klon LT1	

human CD123 FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG2a, Klon AC145	
human CD141 (BDCA-3) APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG1, Klon AD5-14H12	
human CD303 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG1, Klon AC144	
human CD304Miltenyi (BDCA-4/Neuropilin-1) PE	Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG1, Klon AD5-17F6 <sup>1</sup>	
PE Mouse Anti-Human CD40	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG1,κ, Klon 5C3	
PE Mouse Anit-human CD80	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG1, κ, Klon L307,4	
PE Mouse Anti-Human CD86	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG1, κ, 2331(FUN-1)	
PE Mouse Anti-Human HLA-DR	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Mouse IgG2a, Klon L243	

### 3.1.7. *Micro Beads*

CD14 Micro Beads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Mouse IgG2a	

### 3.1.8 Fertige Reagenzienkits

#### ELISA:

BD OptEIA™ Assay Diluent	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL1-β ELISA Set	eBioscience, Inc, San Diego, USA
Human IL-2 ELIS Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego,
USAHuman IL-5 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL-10 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL-12 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human IL-18 ELISA Set	Bender MedSystems, Vienna, Austria

Human IL-23 ELISA Set	eBioscience, Inc, San Diego, USA
Human IFN- $\gamma$ ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Human TNF ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Cell Proliferation ELISA	Amersham Biosciences, Little Chalfont, GB
Durchflusszytometrie:	
BD Cytofix/Cytoperm Kit	BD Biosciences, Heidelberg
PE Annexin V Apoptosis Detection Kitmit 7-Amino- Actinomycin D	BDBiosciences Pharmingen, San Diego, USA

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

15mL-Röhrchen, Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, D
50mL-Röhrchen, Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, D
6-well-plate, Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, D
24-well-plate, Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, D
96-well-plate, Corning Costar 9018	eBioscience, Inc, San Diego, USA
96-well-plate, flat bottom	Becton Dickinson, Le Pont De Claix, F
96-well-plate, U-Shape, Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, D
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Millex®GP Sterilfilter (0,2 $\mu$ m)	Millipore, Carrigtwohill, IRE

### 3.1.10 Computersoftware

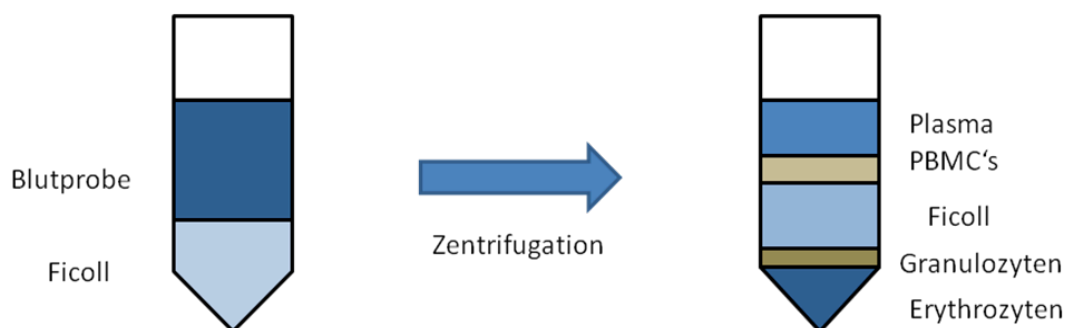
BD FACS Diva Software	Becton Dickinson, Heidelberg, D
CellQuest™, Version 3.2.1f1	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Synelisa Software	Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Freiburg, D
magellan 6 Software	Tecan Austria GmbH, Austria
GraphPad PRISM	Graphpad Software, Inc, La Jolla, USA
IBM SPSS Statistics v19	IBM, Armonk, USA

### 3.2 Methoden

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Reagenzien und Testsysteme gemäß den entsprechenden Herstellerangaben verwendet.

#### 3.2.1 Isolation von PBMC

Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) stammten aus Restblutmaterialien von frischen *buffy coats*. Als *buffy coat* wird die Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma bezeichnet, die bei der Weiterverarbeitung von Vollblutspenden zu Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten, bei der das Vollblut mit Heparin versetzt und zentrifugiert wird, als Nebenprodukt entsteht. Der *buffy coat* besteht hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten und macht nur circa ein Prozent der Blutprobe aus. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte mittels einer Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Paque - ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin mit einer Dichte von 1,077g/ml. Der *buffy coat* wird nach dem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec mit PBS verdünnt und vorsichtig auf Ficoll geschichtet. Durch Zentrifugation mit 400xg lagern sich die dichteren Erythrozytenaggregate und tote Zellen unterhalb der Ficoll- Schicht, das Plasma oberhalb der Ficoll- Schicht ab und Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten bilden einen Interphasering zwischen Ficoll und Plasma. Dieser Interphasering wird abpipetiert und um die Thrombozyten zu entfernen noch zweimal mit nur noch 200xg abzentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in PBS/BSA/EDTA- Puffer aufgenommen und auf Eis gestellt [80].



**Abb. 3.1:** Isolation von PBMC's [80]

### 3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Nach der Isolation der PBMC's, ebenso wie nach Isolierung von Monozyten mittels Automacs (3.3.3), wurde mit Hilfe des Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N (Sysmex) die Zellzahl der Leukozyten bestimmt. Hierbei werden die Größe und die Anzahl der Leukozyten nach der Widerstandsmessmethode bestimmt, wobei man sich die Tatsache zu Nutze macht, dass die Leitfähigkeit einer Zelle nur sehr gering ist und diese beim Passieren einer Elektrolytlösung ein Signal abgibt, welches proportional zur Zellgröße ist.

### 3.2.3 Separation von CD14 positiven Monozyten mit dem AutoMACs™ (*automated Magnetic Activating Cell Sorting*)

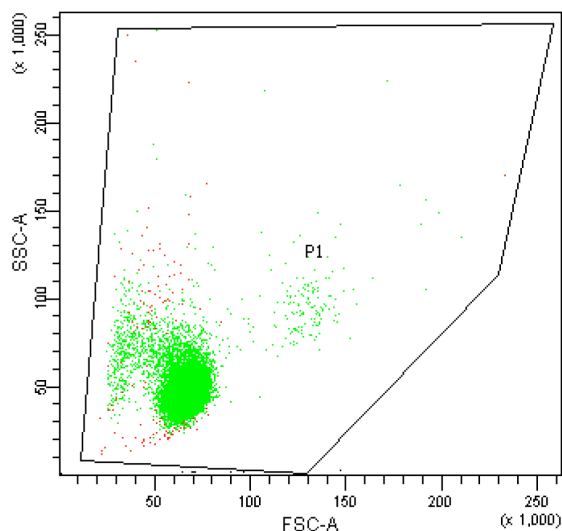
Die Separation der Monozyten erfolgte mit CD14+- Microbeads und dem AutoMACs™ (beides von Miltenyi Biotec). Dabei binden die magnetisch gelabelten CD14-Microbeads direkt an das auf den Monozyten exprimierte CD14. CD14 wird auf Monozyten und Makrophagen stark exprimiert und nur schwach auf neutrophilen Granulozyten und einigen myeloischen dendritischen Zellen. Nach der Zugabe der Microbeads zu den zuvor isolierten PBMC's erfolgte nach 15 Minuten Inkubationszeit eine positive Selektion, d.h. die markierten Zellen werden auf eine mit Eisenkügelchen gefüllte Trennsäule geladen und bleiben durch das Anlegen eines elektromagnetischen Feldes auf der Säule, während die unmarkierten Zellen passieren können. Nach Entfernung der Magnetisierung werden die isolierten Monozyten als positive Zellfraktion ausgegeben. Man hat also im Gegensatz zur negativen Selektion direkt die gewünschten Zellen markiert. Die Beads werden im Verhältnis von 1:5 zu den Zellen gegeben, die Suspension wird dann bei 4° C 15 Minuten inkubiert, die Separation der Monozyten erfolgt mit dem Programm „Posseld“, bei dem der Durchlauf über die Säule zweimal hintereinander erfolgt und somit eine höhere Reinheit gegeben ist. Aus der positiv- Fraktion wird ein Aliquot entnommen und 1:10 verdünnt die Zellzahl am Automatischen Hämatologieanalysator KX-21N bestimmt.



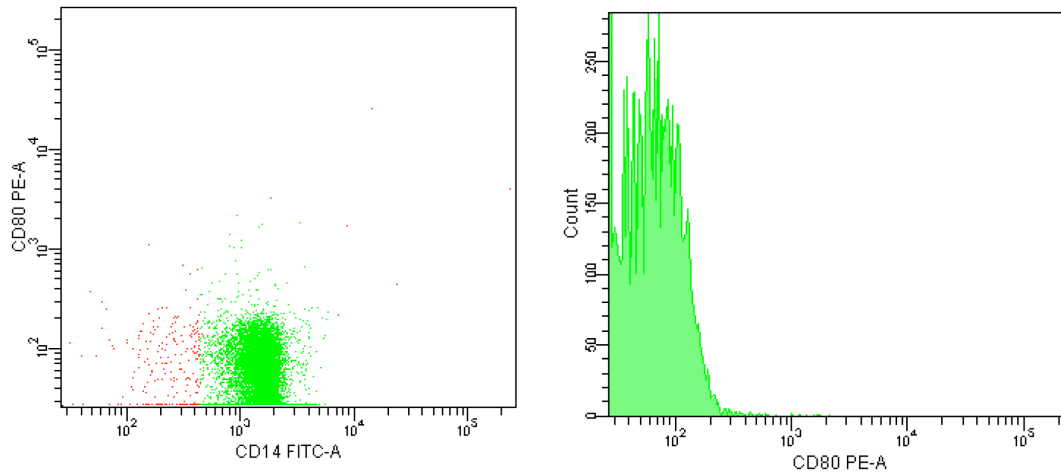
### 3.2.4 Reinheitskontrolle der Monozyten am Durchflusszytometer

Nach der Separation der Monozyten wurde eine Reinheitskontrolle der isolierten Zellfraktion mit Hilfe des Durchflusszytometers, dem FACSCanto™ durchgeführt. Bei der Durchflusszytometrie durchlaufen die zu untersuchenden Zellen eine vibrierende Fließkammer und werden dadurch in Einzelzellsuspension gebracht, in Tröpfchenform werden sie dann an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Tröpfchen sind so klein, dass sie maximal eine Zelle enthalten können [81]. Die enthaltene Zelle lenkt das Laserlicht ab und die somit entstehende Streuung kann nun gemessen werden [82]. Die sogenannte Vorwärts- Lichtstreuung ist abhängig von der Größe der Zellen, die seitliche Lichtstrahlung von ihrer Granularität bzw. dem Plasma/ Kern- Verhältnis. Mittels dieser Methode ist es möglich Monozyten (intermediäres Verhalten) von Granulozyten (große Zellen mit großer Plasma- Kern Relation) und Lymphozyten (kleine Zellen mit hohem Kernanteil) zu unterscheiden. Um die Monozyten noch besser abgrenzen zu können, wurde die Zellsuspension vor der Messung gemäß Protokoll des Herstellers mit einem immunfluoreszenten CD14- Antikörper angefärbt. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert in etwa mit der CD14- Dichte auf der Monozytenoberfläche und wird durch Photomultiplikatoren quantifiziert [81]. Es wird die Fraktion derer Zellen bestimmt, die sowohl in Größe und Granularität den Monozyten entsprechen als auch CD14 positiv sind.

Für die weiteren Versuche wurden ausschließlich Monozyten mit einer Reinheit von über 95% verwendet.



**Abb. 3.2:** Separierte Monozytenpopulation im Forward- und Sideward-Scatter

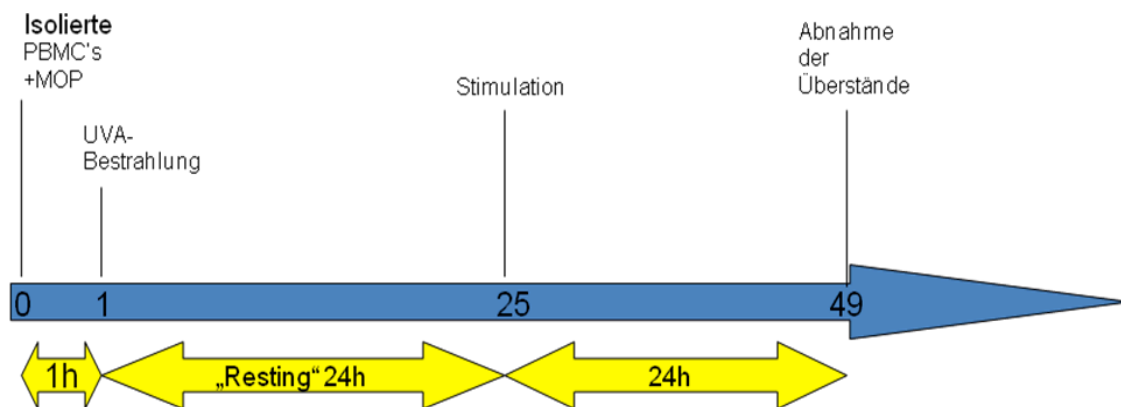


**Abb. 3.3:** Monozytenpopulation nach CD-14 und CD-80 Färbung

### 3.2.5 Photophereesebehandlung von PBMC's und Monozyten

Nach der oben beschriebenen Isolation wurden die PBMC's und Monozyten, die PBMC's mit einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6/\text{ml}$  und die Monozyten mit  $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ , in Dendritenmedium (DC- Kulturmedium) resuspendiert und 8-Methoxypsoralen, das von der Apotheke als 0,002%ige *stock solution* vorbereitet wurde, in einer Endkonzentration von 400ng/ml hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension mit jeweils 200 $\mu\text{l}/\text{well}$  in 96-well *flatbottom* Platten pipettiert. Um Ergebnisabweichungen durch Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten, wurden pro Versuchsgruppe jeweils fünf *wells* angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde im Brutschrank bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 4,7% erfolgte die Photophereesebestrahlung mit UVA- Licht im BIO-LINK® BLX. Die Bestrahlung wurde pro Probe mit zwei, drei beziehungsweise vier Joule pro cm<sup>2</sup> durchgeführt, wobei die Platte ohne Deckel in die zuvor desinfizierte Kammer des BIO-LINK® BLX hineingestellt wurde. Die Bestrahlungsdauer variierte pro Joulezahl zwischen 13 und 20 Minuten. Die Strahlungsintensität wurde mit einem externen Messgerät, dem RM-21 der Firma Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH kontrolliert. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein Dosimetersystem zur Messung von Bestrahlungsstärke und Dosis im optischen Spektralbereich von 200nm bis 700nm. Die zwei an das Dosimeter angeschlossenen Sensoren für UV-A- Licht wurden während der Bestrahlung in der Bestrahlungskammer direkt neben der Kulturplatte platziert. Die Bestrahlungsintensität wurde so justiert, dass alle *wells* der Platte mit mindestens der eingestellten Intensität

bestrahlt wurden. Es wurde jeweils eine Probe mit 8-Methoxypsoralen und eine unbehandelte Probe bestrahlt und immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die weder mit 8-Methoxypsoralen behandelt noch bestrahlt wurde, sowie eine Kontrollgruppe, die zwar mit 8-Methoxypsoralen behandelt wurde, jedoch keine Bestrahlung erhielt. Nach der Bestrahlung erfolgte eine 24-stündige Inkubationszeit, ebenso der Kontrollgruppen, in der die Zellen „ruhen“ sollten, bzw. die Apoptose eingeleitet wurde, bevor die Stimulation folgte. Das Schema in *Abbildung 3.4* soll den beschriebenen Zeitablauf verdeutlichen.



**Abb. 3.4:** Zeitdiagramm der Photopheresebehandlung von PBMC's und Monozyten

### 3.2.6 Apoptosemessung mit 7-AAD und Annexin V

Direkt nach der Bestrahlung ebenso wie nach der Inkubationszeit von 24h erfolgte eine Messung der in den Zellen stattgefundenen Apoptose mithilfe des *PE AnnexinV Apoptosis Detection Kit I* der Firma BD Pharmingen™. Der programmierte Zelltod ist durch zahlreiche morphologische Veränderungen der Zelle gekennzeichnet. Dazu gehören unter anderem der Verlust der Asymmetrie der Zellmembran und der Bindungen an die Nachbarzellen, die Kondensation von Zytoplasma und Zellkern, sowie eine internukleosomale Fragmentierung der DNA. Eines der ersten Ereignisse ist der Verlust der Plasmamembran; das Membranphospholipid Phosphatidylserin wird von der Innenseite der Plasmamembran nach außen gestülpt und dadurch Phosphatidylserin an die Umgebung exponiert [83]. Das Annexin V im *Apoptosis Detection Kit* ist ein 35-36 kDa großes,  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin und bindet an das exponierte Membranphospholipid. Das Annexin V kann mit einem Farbstoff, in diesem Fall

Phycoerythrin (PE) gekoppelt werden und so die Menge der apoptotischen Zellen am Durchflusszytometer gemessen werden. Annexin V ist somit ein Indikator für ein früheres Stadium der Apoptose als Farbstoffe für die Veränderungen im Zellkern. Allerdings kann dabei nicht unterschieden werden, ob der Zelltod durch Apoptose- oder durch Nekroseprozesse eingeleitet worden ist. Deshalb wird die Annexin V Färbung typischerweise mit dem „Vital- Farbstoff“ 7- Amino- actinomycin (7-AAD) durchgeführt. 7-AAD kann als Zellfarbstoff benutzt werden, da es in der DNA zwischen Guanin und Cytosin interkaliert und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Dabei kann allerdings nur die DNA von toten Zellen gefärbt werden, weil der Farbstoff nicht durch eine intakte Zellmembran in die Zelle eindringen kann. Zellen die vital sind, sind in der Färbung PE Annexin V und 7-AAD negativ, Zellen in einem frühen Apoptosestadium sind PE Annexin V positiv und 7- AAD negativ und Zellen in der späten Apoptose oder die bereits tot sind, sind PE Annexin V und 7- AAD positiv [84], [85]. Führt man die Färbungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch, kann eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose der Zellen getroffen werden. Durchwandern die beobachteten Zellen die drei oben genannten Stadien, kann von einer Apoptose ausgegangen werden.

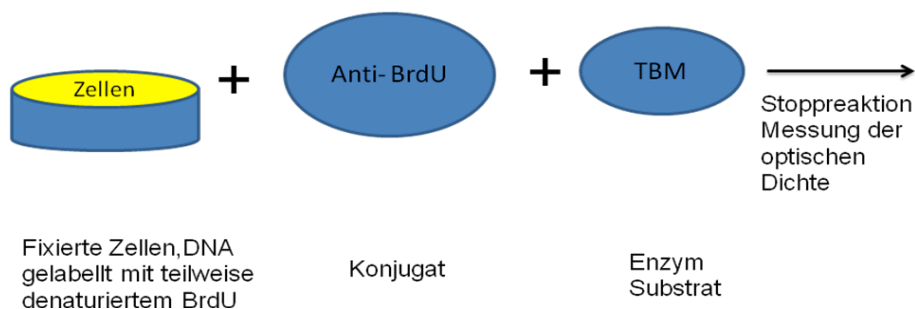
Die Vitalitätsmessung diente in meiner Arbeit zur Überprüfung der Ausgangssituation, in der sich die Zellen nach der Photopheresebehandlung und somit vor der Durchführung der Stimulation befanden.

### **3.2.7 Proliferationstest**

Eine weitere Methode zur Validierung meiner Arbeit war die Durchführung eines Proliferationstestes mit dem Biotrak™ cell proliferation Elisa system, Version 2 von Amersham Biosciences. Dieser Test ist eine schnelle und einfache kalorimetrische Messung, die darauf basiert, dass sich das verwendete 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) während der Zellproliferation in die neu synthetisierte DNA einlagert und damit die gemessene optische Dichte proportional zur Zellvermehrung ist.

Für den Test wurden die Zellen nach Photopherese, ebenso wie eine unbehandelte Kontrollgruppe mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter im DC- Medium auf einer 96 well Platte im Brutschrank inkubiert. Nach 2½ Tagen wurde verdünntes BrdU (0,01mM) zu den Zellen gegeben, gefolgt von weiteren 24h Inkubationszeit.

Während der Inkubationszeit inkorporiert sich das Pyrimidinanalogon anstelle von Thymidin in die DNA. Am dritten Tag wurden die Zellen dann abzentrifugiert, getrocknet, fixiert und geblockt. Durch die Zugabe von Fixierungsmittel kommt es zur Denaturierung der DNA, dieser Prozess ist notwendig um die Detektierung des eingelagerten BrdUs durch den Antikörper möglich zu machen. Als Antikörper wird Peroxidase-gelabeltes anti- BrdU verwendet, das im nächsten Schritt dazugegeben wird und an das, in der frisch synthetisierten DNA eingelagerte, BrdU anbindet. Die resultierende Substratumsetzung führt zu einem Farbumschlag, der bei 450 nm im ELISA Reader SLT Spectra gelesen werden kann.



**Abb. 3.5:** Prinzip des Proliferationstestes [86]

### 3.2.8 Bestimmung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Nachdem wir durch Apoptosemessung und Proliferationstest die Rahmenbedingungen für eine effektive Photopherese festgelegt hatten, wollten wir nun untersuchen, welchen Einfluss die ECP auf Monozyten ausübt. Dazu dienten Färbungen mit Oberflächenmarkern, die Zellzahl der so markierten Zellen wurde wiederum mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Als Marker wurden PE gelabelte CD80, CD86, CD40 und HLA-DR Antikörper verwendet. Der *PE Mouse Anti-human CD 80* Antikörper bindet an B7/BB1 ein 60kDa großes transmembranäses Glycoprotein, das auch als CD80 Molekül bezeichnet wird. Es wird auf aktivierten B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert [87]. Der *PE Mouse Anti-human CD 86* Antikörper ist spezifisch für ein 75kDa großes Oberflächenprotein, das CD86 (B70/B7-2), das vorwiegend auf Monozyten und aktivierten B-Zellen exprimiert wird. CD80 und 86 spielen beide eine große Rolle in der Co-Stimulation von T-Zellen in der primären Immunantwort über die Bindung an CD28 und CTLA-4 [88]. Der *PE Mouse anti-Human CD40* Antikörper reagiert mit einem 45-48kDa großem Typ I Glycoprotein, dem CD40,

das sich auf der Zellmembran vieler Immunzellen, wie Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen, aber auch auf nicht-Immunzellen, wie Endothelzellen befindet. CD40 ist ein kostimulatorisches Molekül und spielt eine zentrale Rolle in zahlreichen Immunantworten [89]. Es interagiert mit dem CD40-*Ligand* (CD40-L), der auf T-Zellen exprimiert wird, die CD-40- CD40-L Interaktion ist entscheidend für die T-Zell Aktivierung [90]. HLA-DR ist ein MHC-II Antigen, das sich vorwiegend auf Antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen und aktivierten T-Zellen befindet [91]. Die Inkubation mit den PE markierten Antikörpern erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Der mit den jeweiligen Oberflächenmarkern gefärbte Anteil der untersuchten Zellen wurde mit Hilfe des Durchflusssytometers, dem FACSCanto™ bestimmt.

### 3.2.9 Stimulation der Zellen mit LPS und R848

Damit in den anschließenden Elisa- Untersuchungen eine bessere Aussagekräftigkeit erzielt werden konnte, wurden zu den mit UVA-Licht und 8-Methoxypsoralen behandelten Zellen, ebenso wie zu den Kontrollgruppen, nach einer Ruhephase von 24 Stunden zwei Stimulantien zugegeben. Bei dem einen Stimulanz handelt es sich um von *Escherichia coli* stammendes, mit  $\gamma$ -Strahlen behandeltes, Lipopolysaccharid (LPS), das in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  zugefügt wurde, bei dem anderen um Resiquimod (R848), dessen Zugabe in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  erfolgte. LPS ist ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien und ein stark immunogenes Antigen mit der Eigenschaft, die Immunantwort auf ein lösliches Antigen zu verstärken und die Zellproliferation von B-Lymphozyten zu steigern [92]. R848 ist eine Komponente des Imidazoquinolins, mit einer stark antiviralen Wirkung. Es aktiviert Immunzellen über TLR4, 7 und 8 [93]. Um auszuschließen, dass die erzielte Interleukinproduktion ausschließlich von der Zugabe der beiden Stimulantien beeinflusst wird, wurde von allen Versuchsansätzen jeweils eine Negativkontrolle ohne LPS/ R848 Stimulation mitgeführt.

### 3.2.10 Stimulation der Zellen mit CD3 und CD28

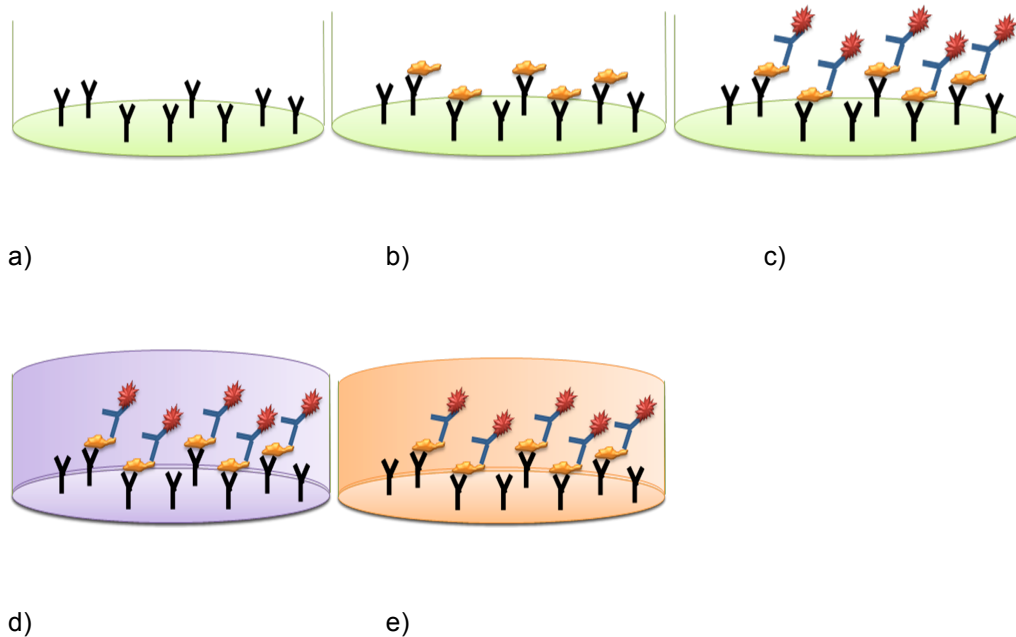
Einige ELISAs wurden auch mit Zellen durchgeführt, die zuvor anstatt mit LPS/R848 mit *purified mouse anti-human* CD3 und CD28 stimuliert wurden. Eine CD3/CD28 Stimulation dient vor allem der Aktivierung von T-Zellen, sie ist nötig, da in Spenderzellen nur sehr wenige antigenspezifische T-Zellen vorhanden sind [94]. Durch

die Bindung des Anti-CD28 Antikörpers an das CD28 Molekül auf den T-Lymphozyten kommt es zu einer erhöhten Proliferation sowie einer gesteigerten Zytokinsekretion der T-Zellen [95]. Desweiteren hat CD28 einen kostimulatorischen Effekt auf die Interaktion zwischen T- und B-Lymphozyten durch die Bindung an CD80 und CD86 auf Antigenpräsentierenden Zellen [96]. Die Stimulation erfolgte analog der LPS-/ R848- Stimulation mit einer jeweiligen Endkonzentration der Stimulantien von 5µl/ml (entsprechend 1 µg/ml).

### **3.2.11 Zytokinnachweis im *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)**

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellkulturen in den 96well flat bottom- Platten abzentrifugiert, dies erfolgte in der Plattenzentrifuge Universal 32 von Hettich Zentrifugen, mit 1200 Umdrehungen pro Minute, ohne Bremse, für die Dauer von zehn Minuten. Anschließend wurden die Zellüberstände abpipettiert und in 24well- Platten gegeben. Dabei werden nun die fünf wells die pro Gruppe angesetzt wurden zusammengeben um einen Mittelwert der produzierten Interleukinmenge zu erzielen. Die 24well Platten wurden direkt danach bei minus 80°C eingefroren und für die durchzuführenden ELISAs wieder aufgetaut. Eine Probe wurde jedoch maximal dreimal wieder aufgetaut und danach verworfen.

Es wurden jeweils ELISAs zur Bestimmung von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, INF $\gamma$ , und TNF nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des *Enzyme linked immunosorbent Assays* besteht darin, dass die ELISA Platten mit einem *Capture Antibody* über Nacht gecoatet werden, so dass dieser am Boden der 96-well Elisa Platte anbinden kann. Nach dem Abwaschen der überschüssigen Antikörper wird die jeweilige Probe und die Standardlösung auf die Platte pipettiert und das zu untersuchende Interleukin kann an den *Coating Antibody* anbinden. Nach Inkubation und Abwaschen des überschüssigen Materials wird der *Detection Antibody*, der sich nun ebenfalls an das zu untersuchende Interleukin anbindet, zugegeben. Der *Detection Antibody* ist konjugiert mit Avidin-HRP (Meerrettichperoxidase), das den Farbumschlag des im nächsten Schritt zugegebenen Substrates katalysiert. Dieser Farbumschlag kann nach der Stoppreaktion bei einer Absorption von 450nm im Sunrise Elisa Reader abgelesen und somit im Vergleich zur angefertigten Standardkurve die Konzentration des jeweiligen Zytokines abgelesen werden.



**Abb. 3.6:** Schematische Darstellung eines ELISA: a) Coating mit Capture Antibody b) Zugabe des Samples c) Detection Antibody konjugiert mit Avidin-HRP d) Zugabe des Substrates e) Stopreaktion

### 3.2.12 Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometer

Um nicht nur die durch die Photopherese verursachte Veränderung der gesamten Fraktion der PBMCs, bzw. der Monozyten, sondern auch den Einfluss auf die unterschiedlichen Zellarten zu überprüfen, wurden T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und die verschiedenen dendritischen Zellen, durch Färbung der für die jeweilige Zellart spezifischen Oberflächenmolekülen am FACSCanto™ differenziert, dabei wurde der Anteil der toten Zellen durch eine Färbung mit CytoxBlue bestimmt und bei den jeweiligen Messungen ausgegrenzt.

Zur Differenzierung der T-Lymphozyten wurde eine Färbung mit CD3- Fluorescein (FITC), CD8- Phycoerythrin (PE), CD45 Peridinin-Chlorophyll (PerCP) und CD4- Allophycocyanin (APC) durchgeführt. Da die gekoppelten unterschiedlichen Farbstoffe vom FACSCanto™ auf unterschiedlichen Wellenlängen des Lasers gelesen werden, ist die gleichzeitige Färbung mit unterschiedlichen Antikörpern möglich. Als zytotoxische



T-Zellen wurden die CD3 und CD45 und gleichzeitig CD8 positiven Zellen abgegrenzt, als T-Helferzellen die CD4 positiven. Zur Bestimmung von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) diente eine Färbung mit CD3 FITC, CD16/CD56 PE, CD45 PerCP und CD19 APC. Als B-Lymphozyten wurden die CD19 positiven und als NK-Zellen die CD16/CD56 positiven Zellen eingegrenzt.

Die dendritischen Zellen lassen sich in drei Untergruppen unterteilen: dendritische Zellen Typ1 (MDC1), dendritische Zellen Typ2 (MDC2) und plasmatische dendritische Zellen (PDCs). Als MDC1 werden die dendritischen Zellen im Blut bezeichnet, die das CD1c (BDCA-1) Antigen exprimieren, zusätzlich sind sie CD11c<sup>bright</sup> und CD123<sup>dim</sup> positiv. CD1c befindet sich auch auf einer CD19-positiven Subpopulation von B-Lymphozyten [97]. Um die Fraktion dieser B-Lymphozyten bei der Messung auszuschließen, erfolgte zusätzlich zu der Färbung mit dem APC gekoppelten CD1c Antikörper eine mit PE gekoppeltem CD19. Die CD19 positiven Zellen wurden bei der anschließenden Auswertung nicht mit eingeschlossen. MDC2s sind myeloische dendritische Zellen, die CD141 (BDCA-3) exprimieren, sie sind CD11c positiv und CD123 negativ [97]. Über CD141 (auch Thrombomodulin) ist bekannt, dass es als Mediator bei der Reaktion zwischen Thrombin und Protein C wirkt und deshalb prothrombotische Wirkung besitzt, es wird auch in sehr geringen Mengen auf CD14 positiven Monozyten ausgebildet [97]. Um diese von der Messung auszuschließen, ebenso wie die B-Lymphozyten, erfolgte wiederum eine zusätzliche Färbung mit FITC gekoppeltem CD14 und PE gekoppeltem CD19. Die plasmatischen dendritischen Zellen lassen sich durch ihre Expressierung von CD303 (BDCA-2) und CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) identifizieren und sind ebenso CD123 positiv auf hohem Niveau, jedoch CD11c negativ [97]. Die Färbung zur Differenzierung erfolgte deshalb mit PE gekoppeltem BDCA-2/BDCA-4 Antikörper, FITC gekoppeltem CD123 und APC gekoppeltem CD11c/CD14.

Die Oberflächenfärbung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dafür wurden von jedem Antikörper jeweils 5µl in ein Facsröhrchen gegeben und dazu 100µl der zu untersuchenden Zellsuspension mit einer Zellzahl von ca. 100 Zellen hinzugefügt. Für jeden Farbstoff wurde auch ein Röhrchen mit der Isotypenkontrolle mitgeführt. Nach kurzem Vermischen erfolgte eine Inkubation im Dunkeln für 15 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, dazu wurden die Röhrchen nach Zugabe von 2ml PBS bei 1300 rpm fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100µl PBS resuspendiert. Anschließend wurde jeweils 1µl von 1:10

verdünntem CytoxBlue Farbstoff hinzugegeben. Die gefärbten Zellfraktionen konnten am Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet werden.

### **3.2.13 Inhibierung der Zytokinproduktion mittels Caspase-Inhibitor**

Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinduktion von Zellen. Wir wollten nun herausfinden, ob sie auch für die Apoptoseinduktion nach Photopherese benötigt werden. Dazu verwendeten wir denselben Versuchsaufbau, wie unter 3.2.5 beschrieben. 24h nach Photopherese wurde zur einen Gruppe, der sogenannte Caspase-Family Inhibitor, der Caspase-1, -3, -6, und -8 Inhibitor enthält, in einer Konzentration von 1µl/ml Zellkultur hinzugegeben, zur Kontrollgruppe DMSO in derselben Konzentration. Nachdem die Zellen für eine Stunde inkubiert wurden, erfolgte die Stimulation mit LPS/R848, wie unter 3.2.9 beschrieben. Nach weiteren 24h Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen und die von den Zellen produzierte Menge von IL-1 $\beta$  bzw. IL-18 im jeweiligen ELISA untersucht.

### **3.2.15 Statistische Analysen**

Zur statistischen Analyse unserer Daten wendeten wir den One-way analysis of variance mit Turkey's multiple comparison Test an, sowie den Two-way analysis of variance. Für die Tests verwendeten wir entweder die GraphPad Prism® Software, Version 5 oder IBM SPSS Statistics v19. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  bezeichnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Validierung der experimentellen Photophorese: Apoptoseinduktion

Wie der Literatur über ECP zu entnehmen ist, löst die Behandlung mit 8-MOP und UV-A die Einleitung der Apoptose der so behandelten Immunzellen aus. Um ein *Setting* für die durchzuführenden Untersuchungen aufzustellen, wollten wir zuerst diesen Effekt nachweisen. Wir untersuchten inwiefern die Photophoresebehandlung mit 8-Methoxypsoralen und einer Bestrahlung mit UV-A Licht in unterschiedlichen Intensitäten die Einleitung von Apoptose in PBMC beeinflusst. Dazu wurde die Vitalität der Zellen mittels einer Färbung mit Annexin V und 7AAD zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Die apoptotischen Zellen wurden zum einen anhand ihrer veränderten Eigenschaften im *Forward*- und *Side*-scatter definiert; sie zeichnen sich durch einen erhöhten *side scatter*, der eine erhöhte Granularität indiziert und einen reduzierten *forward scatter* (geringere Zellgröße) aus [98]. In einer weiteren Darstellung wurde, nach Ausgrenzen von Zelldebris, AnnexinV auf der X-Achse und 7-AAD auf der Y-Achse aufgetragen und der Anteil der Zellen bestimmt, der entweder AnnexinV und 7-AAD negativ war und die vitalen Zellen widerspiegelte, der AnnexinV positiv und 7-AAD negativ war und die Zellen die sich im frühen Stadium der Apoptose befanden darstellte, oder die AnnexinV und 7-AAD positiv waren und die spät apoptotischen Zellen zeigte (Abb. 4.1)

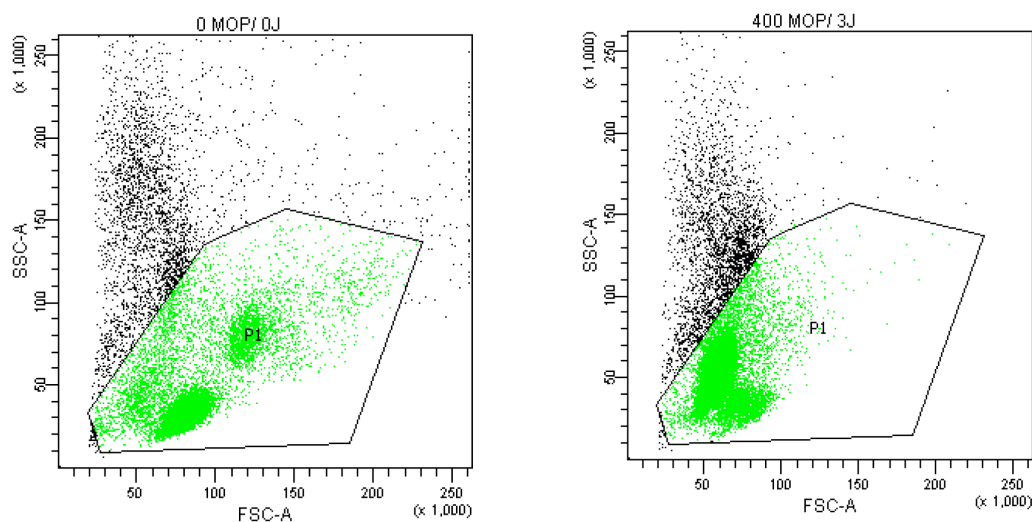


Abb. 4.1a)

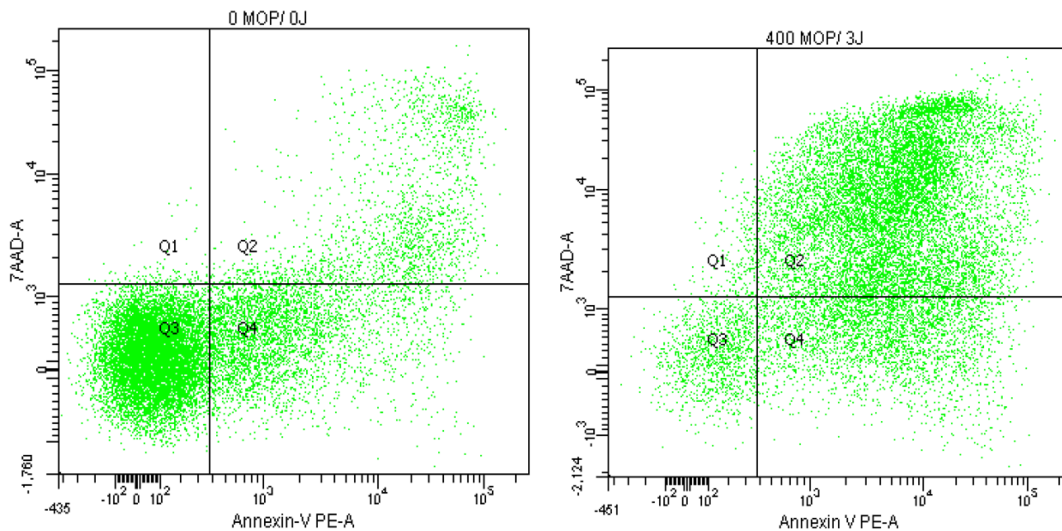
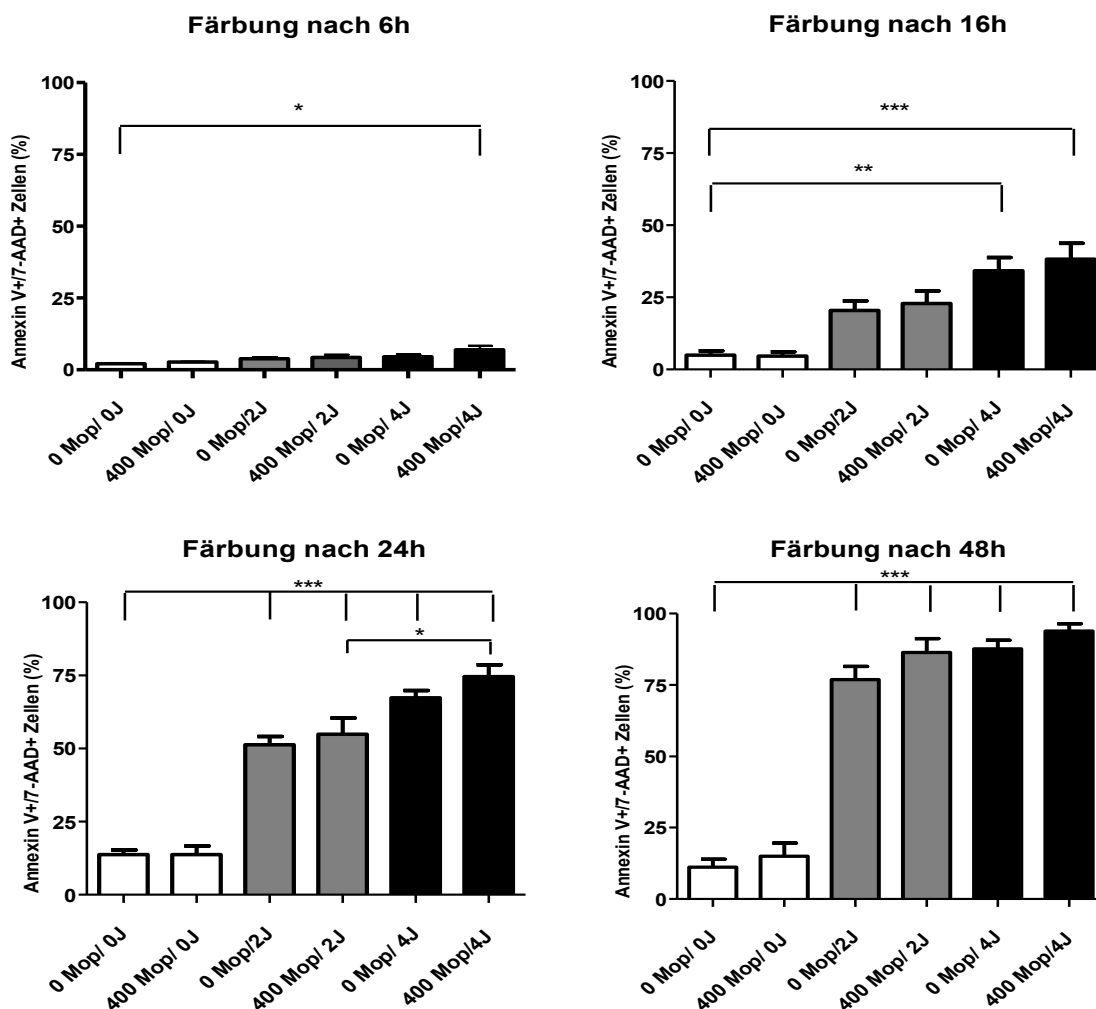


Abb 4.1b)

**Abb. 4.1 a): Darstellung der PBMC im Forward und Side Scatter im Zeitverlauf:** im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen die Zellen nach ECP mit 4J/ 400MOP einen deutlich größeren Anteil der Zellen mit einem erhöhten Side Scatter (entspricht einer erhöhten Granularität der Zellen) sowie einem reduzierten Forward Scatter (entspricht geringerer Zellgröße). **b) Darstellung der AnnexinV/ 7-AAD Färbung im Zeitverlauf:** vergleicht man die mit 4J/400MOP behandelten Zellen mit der unbehandelten Kontrollgruppe zeigt sich nach 24h ein deutlich höherer Anteil der AnnexinV und 7-AAD positiven Zellen.

Die zu vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten Messungen zeigten nach 6h, dass zwar ein Großteil der Zellen in allen Gruppen noch vital war, allerdings bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit der höchsten Dosis unter Zugabe von 8-MOP bestrahlten Zellen. Schon 10h später, befand sich in den bestrahlten Gruppen eine deutlich größere Fraktion in Apoptose, als in den Kontrollgruppen, wobei bei den bestrahlten Zellen kein Unterschied in der Vitalität zwischen mit bzw. ohne 8-MOP behandelten PBMC feststellbar war. Es befand sich allerdings ein deutlich größerer Anteil der mit der stärkeren Dosis bestrahlten Gruppen bereits zu diesem Zeitpunkt im späten Stadium der Apoptose, der programmierte Zelltod wurde also in diesen Zellen früher eingeleitet. 24h nach Photopherese war der größte Teil der bestrahlten Immunzellen im späten Stadium der Apoptose wobei sich auch hier wieder ein Unterschied zwischen den mit 2J und 4J behandelten, aber auch ein geringer Unterschied zwischen 0 MOP/2J und 400 MOP/2J bzw. zwischen 0 MOP/4J und 400 MOP/4J zeigte, der jedoch keine Signifikanz aufwies. Die Färbung nach 48h zeigte ein verhältnismäßig ähnliches Bild.

Um statistisch besser bewerten zu können, ob die Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen alleine von der Bestrahlung stammen oder von der Kombination der Bestrahlung mit 8-Methoxypsoralen, wurde zusätzlich ein two-way-Anova Test durchgeführt. Durch diese Analyse zeigte sich, dass zu allen Zeitpunkten nur der Effekt der Bestrahlung alleine signifikant ist, der Effekt von 8-Methoxypsoralen war nur bei der Messung nach 48h beinahe signifikant {F (1,12)=4,135,  $p < 0,065$ ), es bestand kein Unterschied zwischen der Bestrahlung alleine und der Bestrahlung nach Zugabe von 8-Methoxypsoralen.



**Abb. 4.2: Die experimentelle Photopherese fördert die Apoptose humaner Leukozyten:**  $4 \times 10^5$  pBMCs wurden 6h, 16h, 24h und 48h nach experimenteller Photopherese mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und gemessen. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova + Tuckey's multiple comparison test. ( $n=3$ ,  $\pm$  SE).

## 4.2 Validierung der experimentellen Photopherese: Proliferationshemmung von Lymphozyten

In ihrer Veröffentlichung von 2003 zeigten Jakob et al.[79], dass die Behandlung mit UV-A und 8-Methoxypsoralen die Proliferation der Zellen inhibiert und schlagen vor, diesen Parameter als Qualitätskontrolle der ECP zu verwenden.

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppe gegenüber den Zellen, die ohne die Zugabe von 8-Methoxypsoralen bestrahlt wurden, zeigt sich bereits ein Rückgang der Proliferation, der jedoch nicht signifikant ist (*Abb. 4.3 a*). Beim Vergleich zwischen unbehandelter Kontrollgruppe und den Zellen, welche alleine mit 8-MOP ohne Bestrahlung behandelt wurden (*Abb. 4.3 b*), zeigt sich unabhängig von der MOP-Konzentration kein Unterschied bezüglich der Proliferationsfähigkeit. Durch die Behandlung mit UV-A plus 8-MOP in einer Konzentration von 100ng/ml kam es, sichtbar durch den Abfall der Extinktion auf 0,18 zu einem deutlichen Rückgang der BrdU-Einlagerung, mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$ . Bei 200ng/ml war der Proliferationsrückgang auch gegenüber der ohne MOP bestrahlten Kontrolle signifikant stärker mit  $p < 0,05$ . Mit einer über 200ng/ml ansteigender MOP-Konzentration war keine Verringerung der Extinktion im Vergleich zu dem Ergebnis mit 100ng/ml bzw. 200ng/ml mehr ersichtlich. Führt man auch bei diesen Ergebnissen einen two-way-Anova-test durch, lässt sich feststellen, dass das 8-MOP alleine eine signifikante Auswirkung auf die Proliferation der PBMC hat,  $\{F(5,24)=4,26, p<0,006\}$ , ebenso wie die Bestrahlung alleine,  $\{F(1,24)=224,78, p<0,000\}$ , beide Faktoren zusammen führen zu einer beinahe signifikanten Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Auswirkung der beiden Faktoren alleine  $\{F(5,24)=2,336, p<0,073\}$ . Um eine ausreichende Konzentration von 8-MOP zu gewährleisten wurden die folgenden Experimente durchgehend mit einer Konzentration von 400ng/ml durchgeführt.

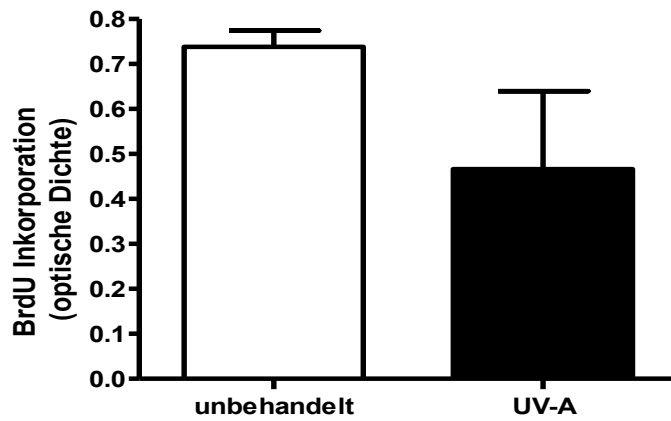


Abb. 4.3 a)

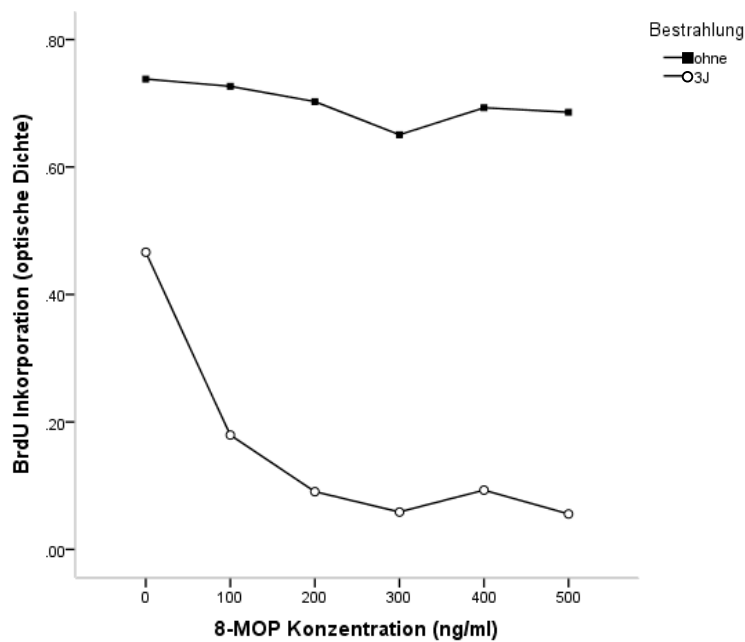


Abb. 4.3b)

**Abb. 4.3: Die experimentelle Photopherese hemmt die Proliferation von PBMC:** a) Bei alleiniger Bestrahlung mit UVA zeigt sich kein Rückgang der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe b) Im two-way-Anova test zeigen beide Variablen alleine einen signifikanten Effekt auf die Proliferation, die Interaktion zwischen beiden Faktoren ist nahezu signifikant  $\{F(5,24)=2,336, p<0,073\}$

### 4.3 Photophorese stimuliert die Exprimierung von Kostimulator-molekülen

Nachdem festgelegt war, alle weiteren Versuche mit  $2\text{J}/\text{cm}^2$  und  $4\text{J}/\text{cm}^2$  (teilweise auch mit  $3\text{J}/\text{cm}^2$ ) und mit 8-Methoxypsoralen in einer Konzentration von  $400\text{ng}/\text{ml}$  durchzuführen, war unser nächstes Ziel, herauszufinden, welchen Einfluss die ECP auf Monozyten ausübt. Dazu erschien es uns sinnvoll, die spezifischen Kostimulator-moleküle der behandelten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu betrachten. Zur Durchführung verwendeten wir Phycoerythrin (PE) gekoppelte CD80-, CD86-, CD40- und HLA-DR- Antikörper.

Betrachtet man nun die Auswirkung der Photophorese auf die Expression von CD80 lässt sich feststellen, dass sich bei der Messung nach 72h ein signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den Photophorese behandelten Zellen mit  $2\text{J}/400\text{MOP}$  und  $3\text{J}/400\text{MOP}$  einstellt, während es bei den alleine mit UVA-Licht bestrahlten Zellen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe gibt: es besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Fraktion  $2\text{J}/0\text{MOP}$  und  $2\text{J}/400\text{MOP}$ , sowie  $3\text{J}/0\text{MOP}$  und  $3\text{J}/400\text{MOP}$ . Diese Beobachtung lässt sich auch im two-way-Anova-test bestätigen, 8-MOP alleine, so wie die Bestrahlung alleine wirken sich signifikant auf die Expression des CD80 aus, die stärkste Auswirkung besteht aber bei einer kombinierten Anwendung der beiden Faktoren  $\{F(3,24)=11,054, p<0,000\}$ . Bei der Beobachtung der CD80-Expression über den Zeitverlauf, ist nach 48h ein starker Anstieg bei den mit  $2\text{J}/400\text{MOP}$  behandelten Zellen, aber auch ein Anstieg in der Kontrollgruppe sichtbar, nach 72h hat sie sich bei den Zellen nach ECP noch erhöht und es ist jetzt ein hoch signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Zellen feststellbar.

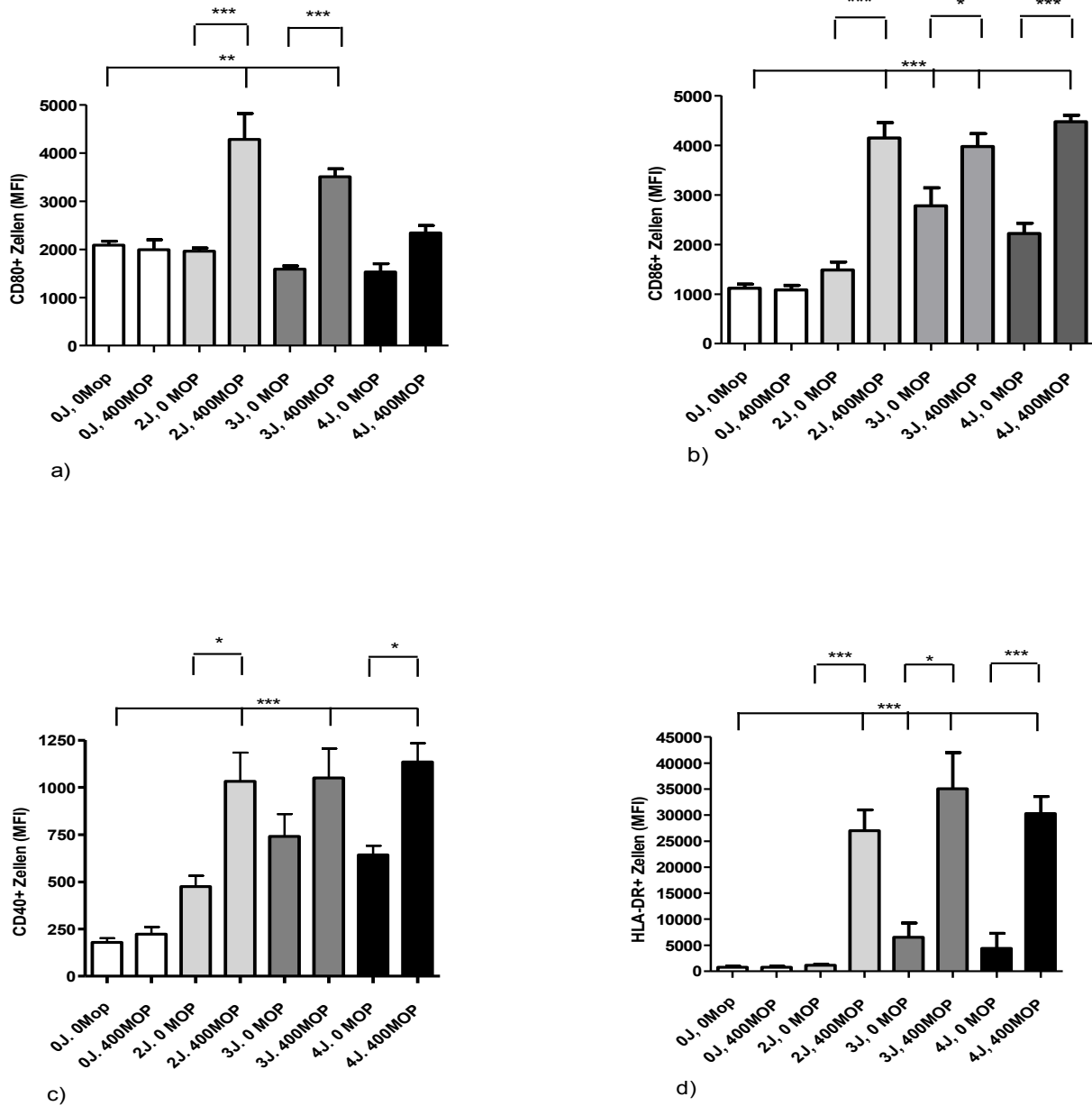
Bei den Färbungen vom Oberflächenmolekül CD86 bleibt die Kontrollgruppe mit ihrer Expression im Verlauf der Zeit ziemlich konstant, bei den Photophorese behandelten Zellen hingegen zeigt sich schon nach 24h ein Anstieg, der sich bei der Messung nach 48h verstärkt darstellt und zum Zeitpunkt 72h hochsignifikant ist. Vergleicht man alle Gruppen zum Zeitpunkt 72h, kann man sehen, dass die mit 8-Methoxypsoralen behandelten Zellen, unabhängig von der Bestrahlungsstärke deutlich mehr CD86 exprimieren als die Kontrolle. Auch hier zeigt sich wieder ein deutlicher Unterschied zwischen alleiniger Bestrahlung und der Kombination mit 8-MOP in den unterschiedlichen Joulestärken, was sich durch die im two-way-Anova test signifikante Interaktion der beiden Variablen beweisen lässt  $\{F(3,24)=14,802, p<0,000\}$ . Verfolgt man die CD40 Expression im Zeitverlauf, dann ist sie nach 24h bei unbehandelten und mit  $2\text{J}/400\text{MOP}$  Zellen gleich, nach 48h ist ein deutlicher Unterschied sichtbar, der bei



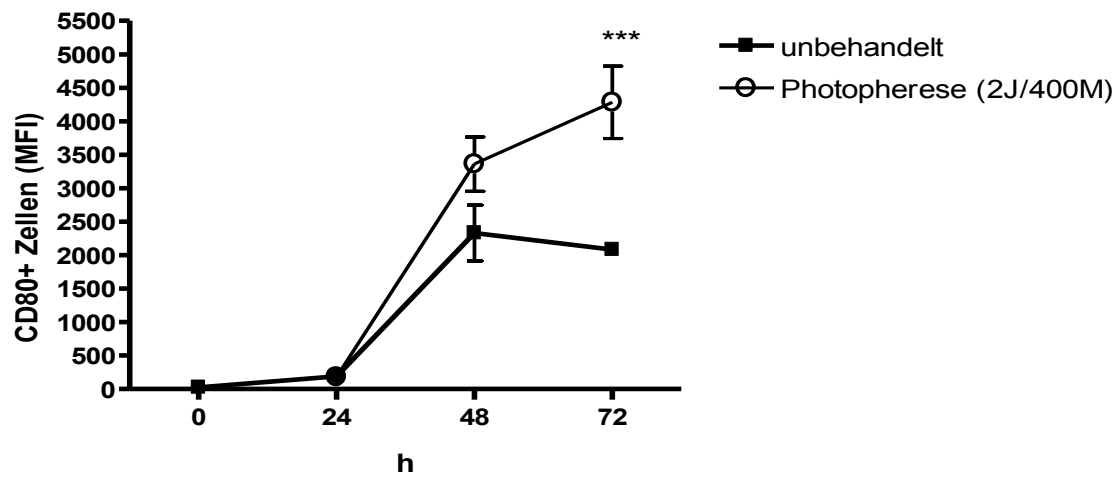
der Messung nach 72h hochsignifikant ist. Dies trifft ebenso für die übrigen Bestrahlungsintensitäten zu, wie aus *Abb. 4.5 c)* ersichtlich wird. Im two-way-Anova test ist die Interaktion zwischen 8-MOP Gabe und Bestrahlung nur beinahe signifikant mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von  $\{F(3,24)=2,661, p< 0,071\}$ , was sich am wahrscheinlichsten durch ein zu niedriges n erklären lässt.

Während bei der unbehandelten Kontrolle nach 72h Inkubation nahezu kein HLA-DR exprimiert wird, ist dieses bei 2J/400MOP, 3J/0MOP, 3J/400MOP und 4J/400MOP signifikant erhöht. Es besteht wie bei den anderen Oberflächenstrukturen wieder ein signifikanter Unterschied, innerhalb der unterschiedlichen Bestrahlungsstärken, zwischen mit und ohne 8-MOP bestrahlten Monozyten. Der two-way-Anova test zeigt eine neben der signifikanten Auswirkung von 8-MOP alleine und der Bestrahlung alleine, eine hochsignifikante Interaktion der beiden Variablen  $\{F(3,24)=7,948, p<0,001\}$ . Schon bei der Messung nach 48 ist der Anstieg bei den 2J/400MOP behandelten Monozyten signifikant

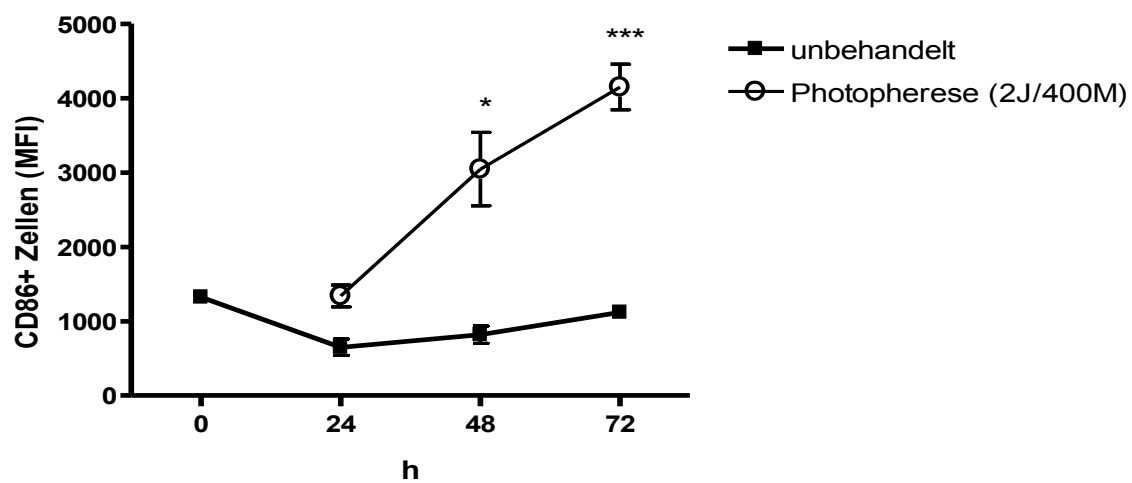
Die ECP von Monozyten führt also 72h nach der Therapie zu einem überaus deutlichem Anstieg der Oberflächenstrukturen CD80, CD86, CD40 und HLA-DR.



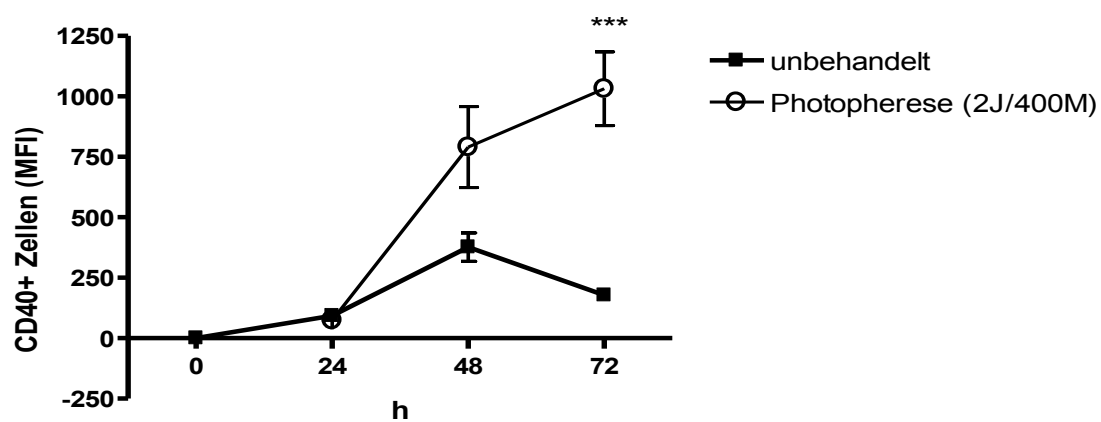
**Abb. 4.4: Kinetik der Oberflächenexpression von Kostimulatormolekülen auf Monozyten durch experimentelle Photopherese nach 72h:** a) Signifikanter Anstieg von CD80 auf Photopherese behandelten Monozyten gegenüber Kontrolle und Bestrahlung ohne 8-MOP b) Signifikanter Anstieg der Expressierung von CD86 bei 8-MOP/ 2J, 3J und 4J behandelten Zellen. c) Erhöhte CD40 Expression auf bei 8-MOP/ 2J, 3J und 4J behandelten Zellen. d) Ohne Bestrahlung nahezu keine Expressierung von HLA-DR, bei Behandlung mit 8-MOP und Bestrahlung in den unterschiedlichen Intensitäten deutlicher Anstieg. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova test Tuckey's multiple comparison test. ( $n=4 \pm SE$ ).



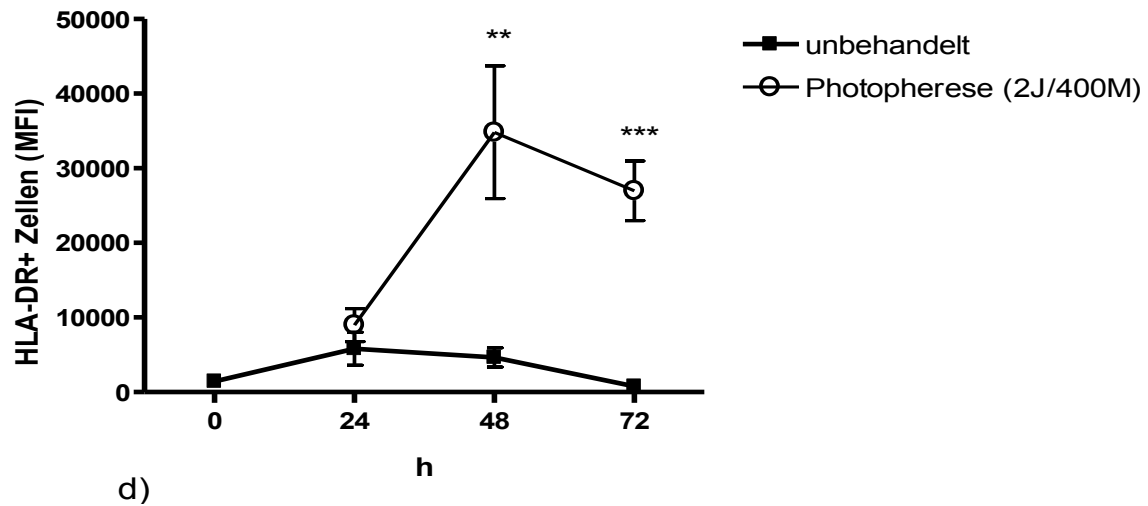
a)



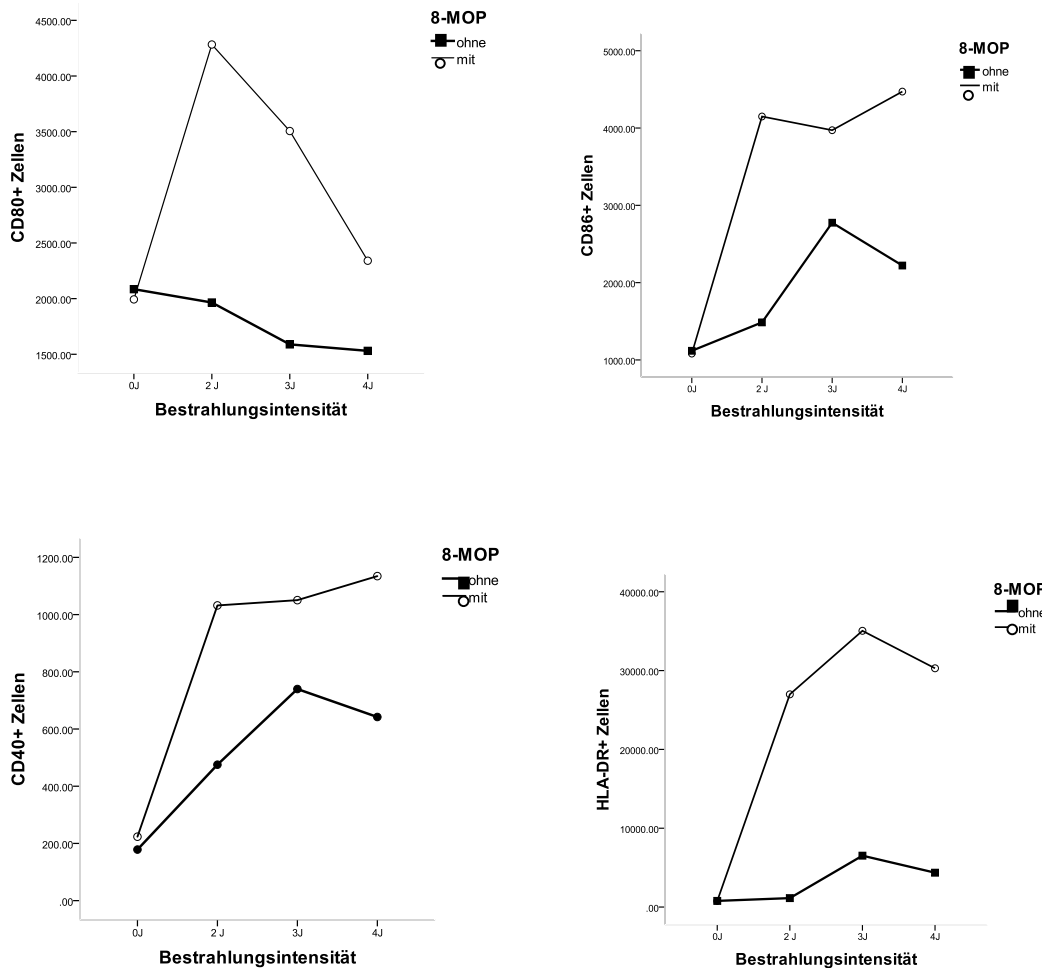
b)



c)



**Abb. 4.5: Kinetik der Oberflächenexpression von Kostimulatormolekülen auf Monozyten durch experimentelle Photopherese:** a) Expression von CD80, b) Expression von CD86, c) Expression von CD40, d) Expression von HLA-DR: entschiedener Anstieg der jeweiligen Oberflächenmarker in den Photopherese behandelten Monozyten 48h nach ECP der auch nach 72h weiter bestehen bleibt. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova + Tuckey's multiple comparison test ( $n=4 \pm SE$ ).



**Abb. 4.6:** 8-MOP und Bestrahlung mit UVA verstärken sich gegenseitig in ihrer Wirkung auf die Oberflächenexpression von Kostimulatormolekülen auf Monozyten: **a)** Hochsignifikante Interaktion des Effektes der beiden Variablen auf die CD80 Expression  $\{F(3,24)=11,054, p < 0,000\}$  und die **b)** Expression von CD86  $\{F(3,24)=14,802, p < 0,000\}$  **c)** Beinahe signifikante Interaktion des Effektes auf die Expression von CD40  $\{F(3,24)=2,661, p < 0,071\}$  **d)** Hochsignifikante Interaktion bei der Expression von HLA-DR  $\{F(3,24)=7,948, p < 0,001\}$

#### 4.4 Photopherese inhibiert die Produktion von IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70 und INF- $\gamma$ in PBMC

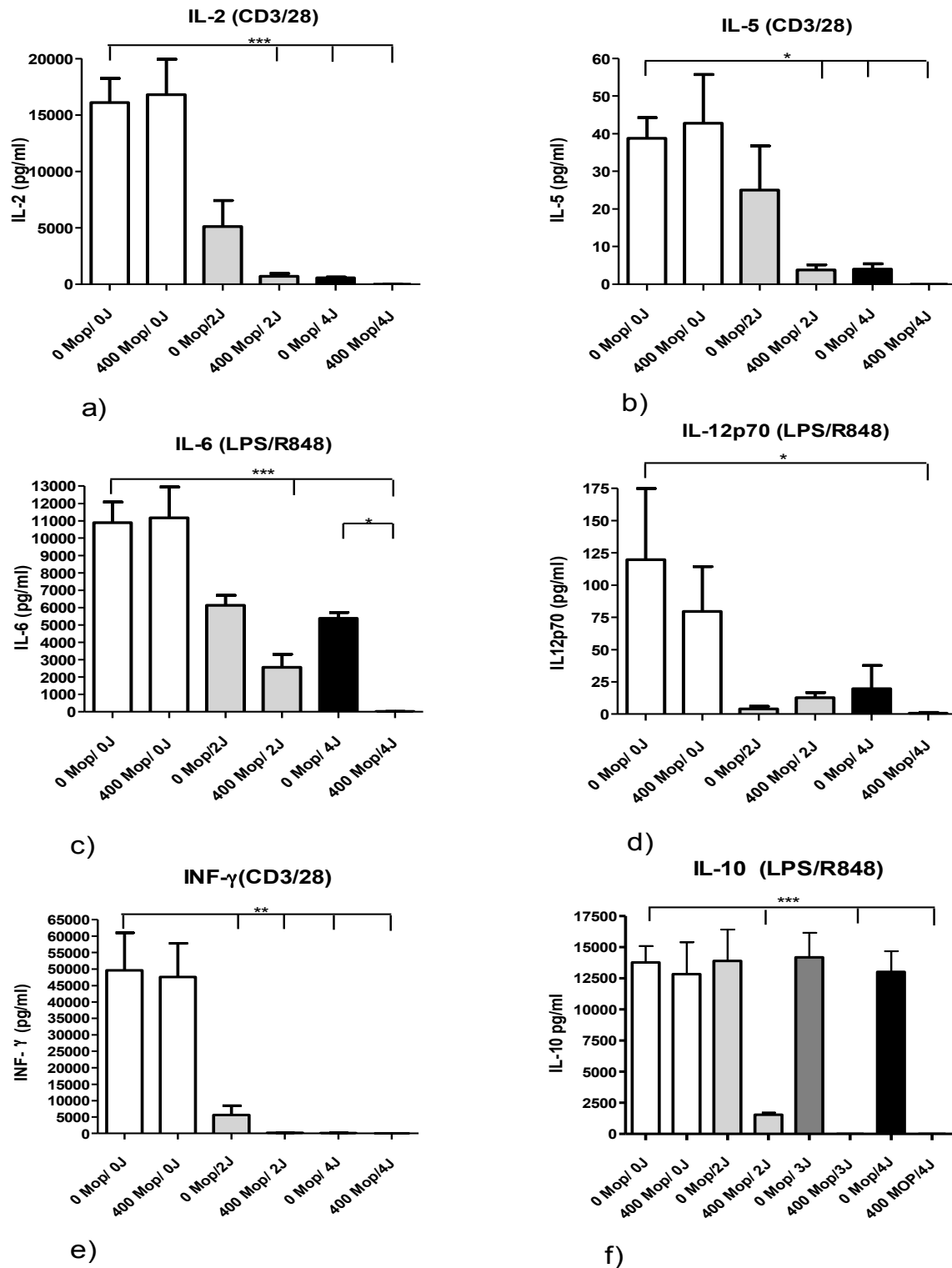
Da die ECP den Zelluntergang der behandelten Zellen hervorruft, könnte man annehmen, dass mit Einleitung der Apoptose auch die Produktion von Zytokinen versiegt. Von einigen Zytokinen ist bereits bekannt, dass ihre Produktion gehemmt wird, in der Arbeit von Tokura et al. [99] wird jedoch beschrieben dass es durch die

Photopherese von PBMC zu einer Hochregulation von INF- $\gamma$  und IL-2 kommt. Wir führten zur Untersuchung der Zytokinproduktion ELISAs der jeweiligen Zytokine durch. Dazu benutzten wir die Zellüberstände von Photopherese behandelten Zellen und deren unbehandelten Kontrollen, die 24h nach der Bestrahlung entweder mit LPS/R848 oder CD3/28 stimuliert worden waren und nach weiteren 24h Inkubationszeit abzentrifugiert wurden. Bei den Zellen handelte es sich um isolierte PBMC. Weil die Zytokine IL-2, IL-5 und INF- $\gamma$  vorwiegend von T-Lymphozyten produziert werden, benutzten wir zu deren Messung mit CD3/CD28 stimulierte PBMC, die Stimulation mit CD3/CD28 führt nämlich zu einer Aktivierung der T-Zellen. Im ELISA war bei allen drei Zytokinen mit einer Bestrahlung von  $2\text{J}/\text{cm}^2$  ohne 8-Methoxypsoralen eine leichte Suppression der Produktion im Gegensatz zu den unbestrahlten Kontrollen ersichtlich, bei den mit 400MOP bei 2J und den bei 4J bestrahlten Zellen zeichnete sich diese Supprimierung noch viel deutlicher ab. Im two-way-Anova test war nur die Wirkung der Bestrahlung alleine signifikant, IL-2  $\{F(2,18)=45,091, p < 0,000\}$ , IL-5  $\{F(2,18)=13,737, p < 0,000\}$ , INF- $\gamma$   $\{F(2,18)=36,412, p < 0,000\}$ , die Zugabe von 8-MOP führte zu keiner signifikanten Veränderung der Interleukinproduktion, ebenso wenig wie die Kombination der beiden Faktoren.

Für die Messung der Interleukine 6, 10 und 12p70 verwendeten wir mit LPS/R848 stimulierte PBMC. Analysiert man nun die Produktion von IL-6, lässt sich feststellen, dass es durch die alleinige Bestrahlung mit 2J bzw. 4J zwar zu einem signifikanten Rückgang der Produktion kommt, dieser aber nur bei der zusätzlichen Behandlung mit 8-MOP bei beiden Bestrahlungsstärken hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber der unbehandelten Kontrolle ist. Auch im two-way-Anova test lässt sich ein signifikanter Effekt der Bestrahlung alleine  $\{F(2,18)=42,143, p < 0,002\}$ , sowie des 8-MOP alleine  $\{F(1,18)= 13,509, p < 0,002\}$  und ebenso eine signifikante Verstärkung des Effektes durch die Kombination der beiden Parameter  $\{F(2,18)= 4,526, p < 0,026\}$  feststellen. Bei IL-12p70 kommt es in allen vier Bestrahlungsgruppen zu einem deutlichen Rückgang der Zytokinproduktion gegenüber den unbestrahlten Kontrollen. Im two-way-Anova erweist sich nur der Effekt der Bestrahlung alleine als signifikant  $\{P(2,48)=7,097, p < 0,002\}$ . Darüber hinaus untersuchten wir die Produktion von IL-10: die Zytokinproduktion von mit 400MOP in den unterschiedlichen Intensitäten bestrahlten PBMC reduzierte sich hochsignifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, während die ohne MOP bestrahlten Zellen keinerlei Veränderung ihrer IL-10 Herstellung gegenüber der Kontrolle zeigten. Der two-way-Anova test bestätigt das Ergebnis, dass es durch die Kombination von 8-MOP mit der Bestrahlung zu

einem signifikant stärkeren Effekt als durch die beiden Variablen alleine kommt { $F(3,24)=7,152$ ,  $p < 0,001$ }.

Als Folge der ECP, bei einigen Zytokinen auch schon durch die alleinige Bestrahlung mit UV-A Licht, kommt es also bei IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und INF- $\gamma$  zu einer sehr deutlichen Supprimierung ihrer Produktion.



**Abb. 4.7:** Die experimentelle Photopherese reduziert die Produktion von IL-2, IL-5 und INF- $\gamma$  in mit CD3/28 stimulierten PBMC sowie die IL-6, IL-12p70 und IL-10 Produktion von LPS/R848 stimulierten PBMC: IL-2: n=4, IL-5: n=4, IL-6: n=5, IL-12: n=9, INF- $\gamma$ : n=4, IL-10: n=4, \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova test + Tuckey's multiple comparison test. ( $\pm$  SE).



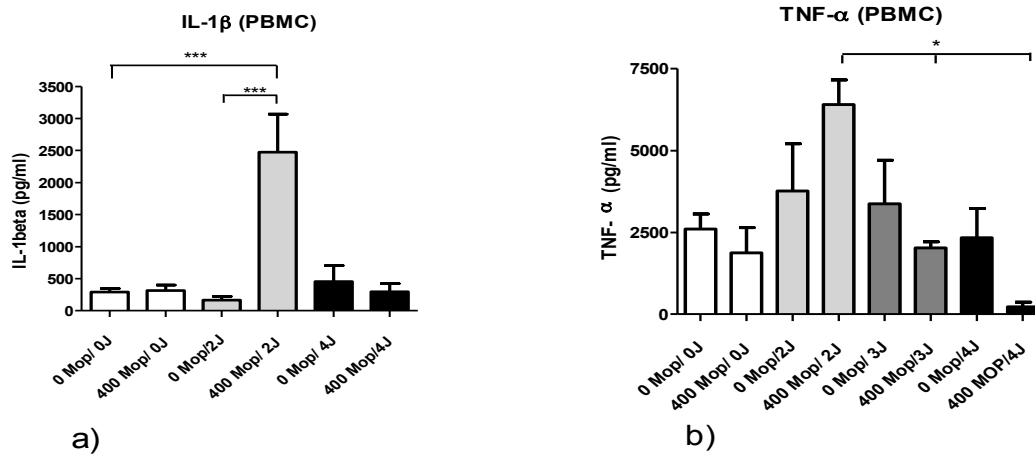
#### **4.5 Photopherese in niedriger Bestrahlungsstärke stimuliert die Produktion von IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$**

Bei anderen Zytokinen stellten wir jedoch unerwarteterweise einen stimulierenden Effekt der ECP auf die Zytokinausschüttung fest. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt bei der Messung von IL-1 $\beta$ , welches von mit LPS/R848 stimulierten PBMC produziert worden war. Wir beobachteten dass die Produktion des Interleukins durch eine Bestrahlung mit 2J/cm<sup>2</sup> zusammen mit 8-MOP stark angeregt wurde und gegenüber der unbehandelten Kontrolle hochsignifikant erhöht war. Dies galt aber nur für eine Bestrahlungsstärke von 2J, bei 4J spielte es keine Rolle, ob die Bestrahlung mit oder ohne Methoxypsoralen stattfand, es kam in beiden Fällen zu einer Supprimierung der Zytokinproduktion. Auch der two-way-Anova test zeigte bei der Kombination der beiden Faktoren 8-MOP und Bestrahlung eine signifikante verstärkte Wirkung auf die Produktion von IL-1 $\beta$  mit {F(2,42)=13,003, p< 0,000}.

Für die Bestimmung von TNF- $\alpha$  wurden ebenfalls mit LPS/R848 stimulierte PBMC verwendet. Es zeigte sich ein, der IL-1 $\beta$  Produktion ähnliches Bild, die Produktion von TNF- $\alpha$  wurde durch Photopherese mit niedriger Bestrahlungsintensität von 2J und der gleichzeitigen Behandlung mit 400MOP angeregt und bei Bestrahlung mit höheren Intensitäten gehemmt. Im two-way-Anova zeigte sich der Effekt der Bestrahlung alleine als beinahe signifikant mit {F(3,24)=2,621, p< 0,074}.

Wie bereits erwähnt, wurde von Tokura et al. [99] publiziert, dass die Photopheresetherapie in einer geringeren Bestrahlungsdosis von 1J/cm<sup>2</sup> bei CTCL-Patienten zu einem Anstieg der INF- $\gamma$  Produktion von PBMC führte. Wir sahen eine generelle Reduktion von INF- $\gamma$  in allen bestrahlten Gruppen, allerdings war diese, bei Bestrahlung mit 2J und gleichzeitiger MOP Gabe weniger stark ausgeprägt, so dass bei 2J/400MOP eine größere Menge an Zytokin vorhanden ist, als bei Bestrahlung mit 2J ohne MOP. Im two-way-Anova erwies sich jedoch nur die Wirkung der Bestrahlung als signifikant {F(2,36)=5,345, p< 0,009}, es konnte keine Interaktion zwischen den beiden Faktoren nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ECP von PBMC mit einer niedrigeren Bestrahlungsstärke neben der Supprimierung zahlreicher Interleukine, auch die Produktionssteigerung anderer Zytokine zur Folge hat.

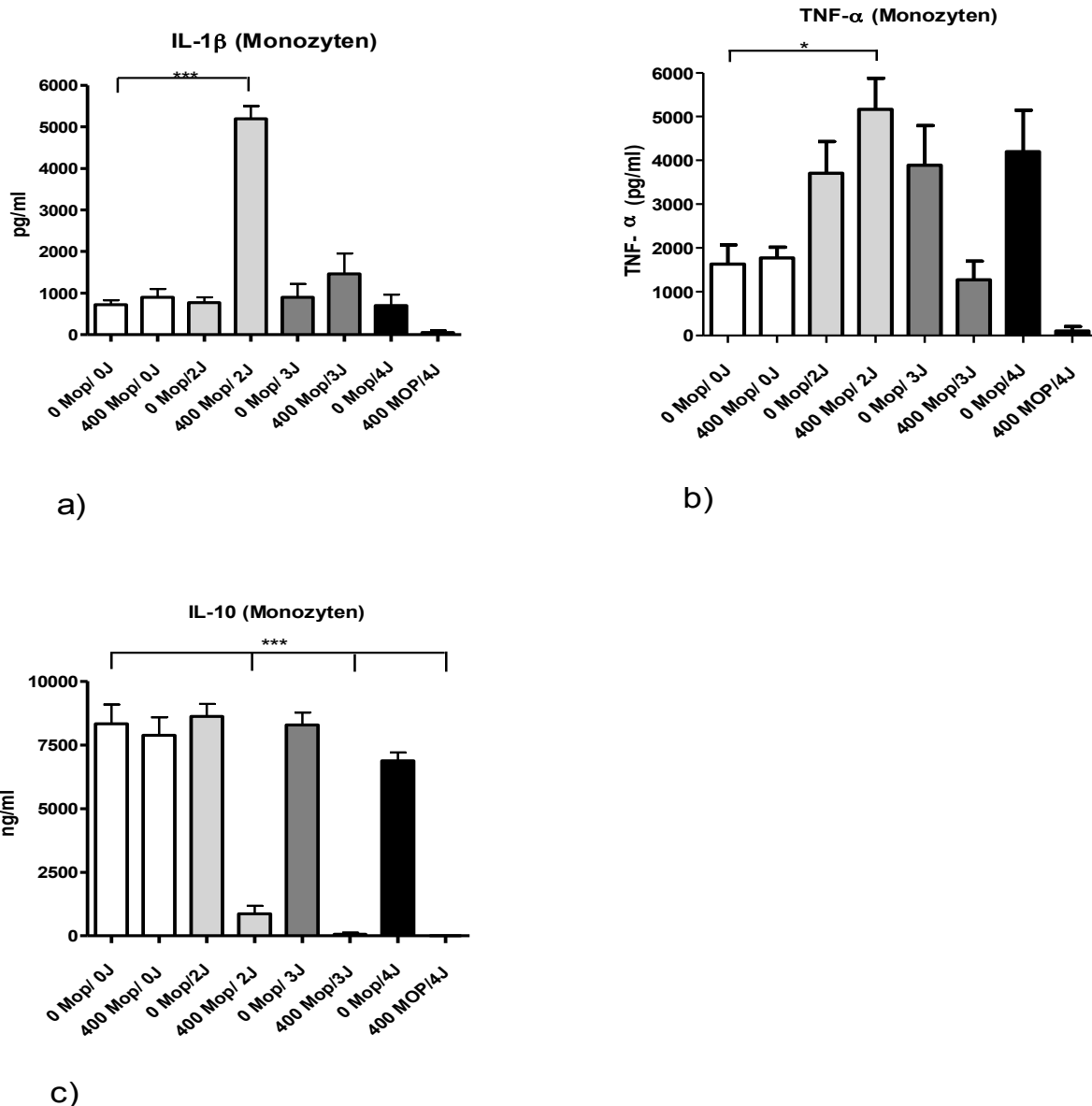


**Abb. 4.8:** Die experimentelle Photopherese stimuliert die Produktion von IL-1 $\beta$ , und TNF- $\alpha$  in mit LPS/R848 stimulierten PBMC bei einer Bestrahlungsintensität von 2J. IL-1 $\beta$ :  $n=8$ , TNF- $\alpha$ :  $n=4$  \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova test + Tuckey's multiple comparison ( $\pm$  SE).

#### 4.6 Veränderungen der Zytokinproduktion von Photopherese behandelten Monozyten korreliert mit den Ergebnissen bei PBMC

Nach dem Nachweis dieser Veränderungen der Zytokinproduktion nach experimenteller Photopherese bei PBMC, stellte sich nun die Frage, ob eine solche Steigerung der Produktion bestimmter Zytokine auch bei Monozyten nachgewiesen werden kann. Dazu isolierten wir Monozyten aus PBMC mithilfe des AutoMACS™ Separator und magnetisch markierten CD14- *Microbeads*. Die Reinheit der isolierten Monozyten betrug jeweils  $>95\%$ . Auch die Monozyten wurden 24h nach ECP mit LPS/R848 stimuliert. Wir untersuchten die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-10. Bei dem Interleukin IL-1 $\beta$  zeigte sich wiederum eine Steigerung der Produktion von mit 400MOP/2J behandelten Zellen, die gegenüber der unbehandelten Kontrolle hochsignifikant erhöht war. Ihre TNF- $\alpha$  Produktion steigerten die Monozyten auch nach alleiniger Bestrahlung mit 2, 3 oder 4J/cm<sup>2</sup>, jedoch war, bei den mit 2J/400MOP Behandelten, die Produktion noch deutlicher erhöht und der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant. Auch die IL-10 Produktion der Monozyten korrelierte mit denen der PBMC, es kam zu einem überaus deutlichem Absinken der Konzentration von IL-10 bei Behandlung mit 8-Methoxypsoralen und gleichzeitiger Bestrahlung mit UV-A Licht in der Intensität von 2J, 3J bzw. 4J. Der two-way-Anova test zeigte bei allen 3 Zytokinen einen signifikanten Effekt der Bestrahlung alleine, sowie einen verstärkten

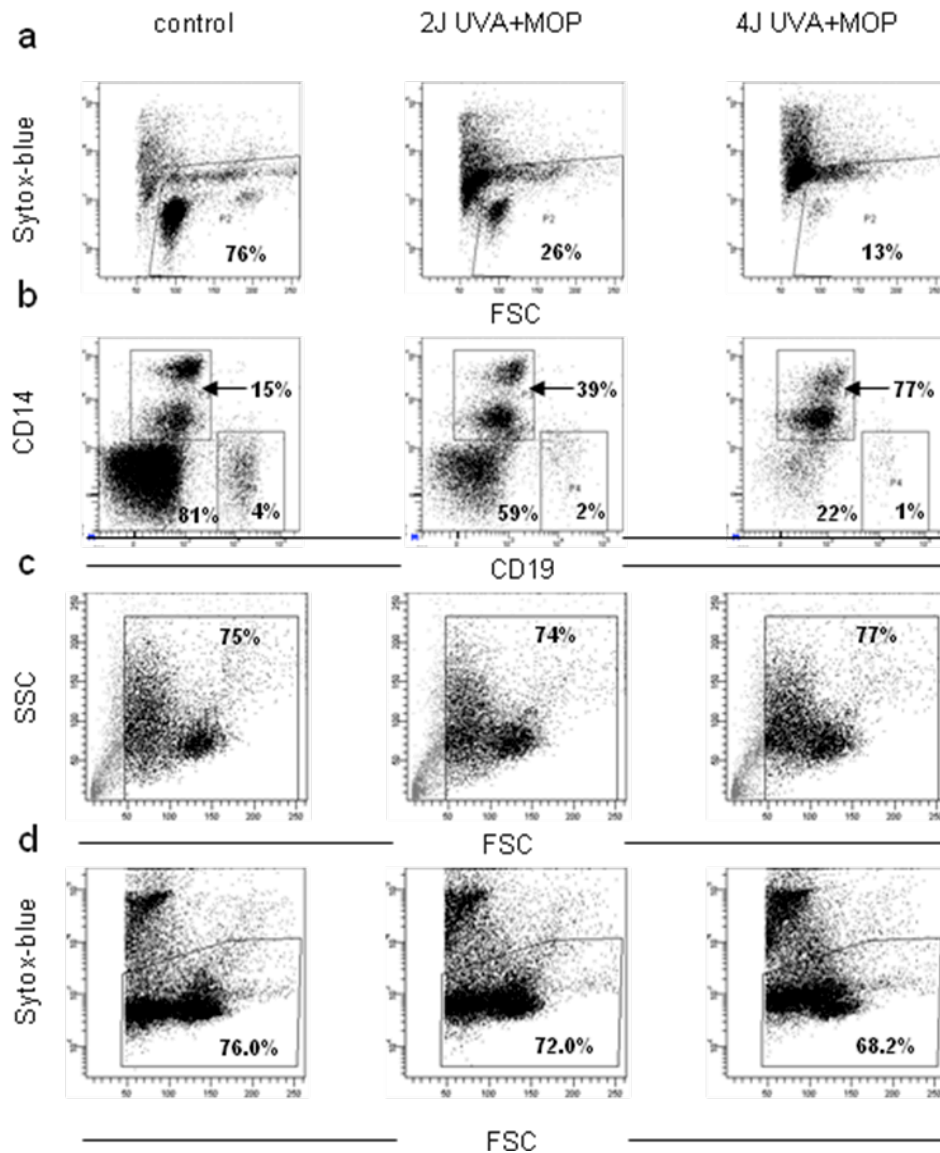
Effekt durch die Kombination der Bestrahlung mit 8-MOP auf die jeweilige Zytokinproduktion. Auch der Effekt durch das 8-MOP alleine erwies sich als signifikant. Es zeigte sich also, dass sich die Monozyten bezüglich ihrer Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-10 nach ECP ganz ähnlich zu den Photopherese behandelten PBMC verhalten.



**Abb. 4.9:** Die experimentelle Photopherese erhöht die Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-23 und TNF- $\alpha$  in mit LPS/R848 stimulierten Monozyten bei einer Bestrahlungsintensität von 2J. IL-1 $\beta$ : n=4, IL-23: n=4, TNF- $\alpha$ : n=4, IL-10: n=4 \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$ , one-way-Anova test + Tuckey's multiple comparison ( $\pm$  SE).

#### **4.7 Die experimentelle Photopherese führt zu einem selektiven Überleben von CD14+ Monozyten**

Nachdem wir nachgewiesen hatten, inwiefern die ECP die Vitalität der gesamten PBMC beeinflusste, wollten wir auch herausfinden, wie die einzelnen Zellarten sich durch die Photopherese verändern. Dazu führten wir, wie bei den Versuchen zuvor die Photopherese mit 2J bzw. 4J/cm<sup>2</sup> durch und führten die jeweiligen Kontrollen mit. Nach 48h erfolgten die Färbungen von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen, B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und den verschiedenen Dendritischen Zellen mit den für die jeweiligen Zellen spezifischen Antikörpern. Die gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet. Neben den spezifischen Antikörpern wurde bei jeder Probe eine zusätzliche Vitalitätsfärbung mit Cytox-blue durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet an die abgestorbenen Zellen und macht es so möglich, die toten Zellen bei der Auswertung auszugrenzen (Abb. 4.10). Durch die Bestrahlung mit 2J bzw. 4J kombiniert mit 8-Methoxypsoralen kam es zu einem deutlichen Absinken der vitalen, Cytox-blue negativen Gesamtpopulation von PBMC auf 26 (24h) bzw. 13% (48h) während ihr Anteil bei den unbehandelten Zellen noch bei 76% lag. Die Differenzierung der Monozyten erfolgte mittels CD14-Antikörper, die der B-Lymphozyten mittels CD19-Antikörper. Betrachtet man die Photopherese behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle, so kommt es durch die Bestrahlung in der Stärke von 2J mit 400MOP zu einem Anstieg des Anteils der Monozyten von 15% (unbehandelt) auf 39%, bei Photopherese mit 4J auf 77% aller Zellen. Der Anteil der CD-19 positiven B-Lymphozyten hingegen, fiel durch die ECP von vier auf zwei (2J/400MOP) bzw. ein Prozent (4J/400MOP). Obwohl die Zellzahl durch die Photopherese insgesamt abnimmt, scheinen die Monozyten resistenter zu dieser Behandlung zu sein, so dass ihr relativer Anteil durch diese zunimmt. Dies geht auch aus den Abbildungen 4.11 c) und d) hervor, in denen nur die CD14 positiven Monozyten dargestellt sind. Die Population der Monozyten bleibt nach Photopheresebehandlung in beiden Strahlungsintensitäten stabil, die Färbung mit Cytox-blue zeigt eine nur leichte Reduktion der vitalen Monozyten bei 2J/400MOP von 76 auf 72%, bei 4J/400MOP auf 68%. Vergleicht man diese Zahlen mit der Verringerung der gesamten PBMC, wird deutlich, dass die Monozyten, sehr viel stabiler gegenüber der Photopheresebehandlung sind und nur ein sehr geringer Teil von ihnen durch die Behandlung zu Grunde geht.



**Abb. 4.10:** Die experimentelle Photopherese erhöht den Anteil an vitalen Monozyten an der vitalen Gesamtpopulation 24h sowie 48h nach der Behandlung von unstimulierten PBMC: a) Reduktion der Cytox-blue negativen vitalen Zellen nach 24 bzw. 48h. b) Erhöhung der CD14<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Monozyten an der Gesamtpopulation c) Population der gesorteten Monozyten bleibt nach 24 bzw. 48h weitgehend stabil. d) Auch bei 4J nur geringfügiges Absinken des Cytox-blue negativen Anteils der Monozyten.

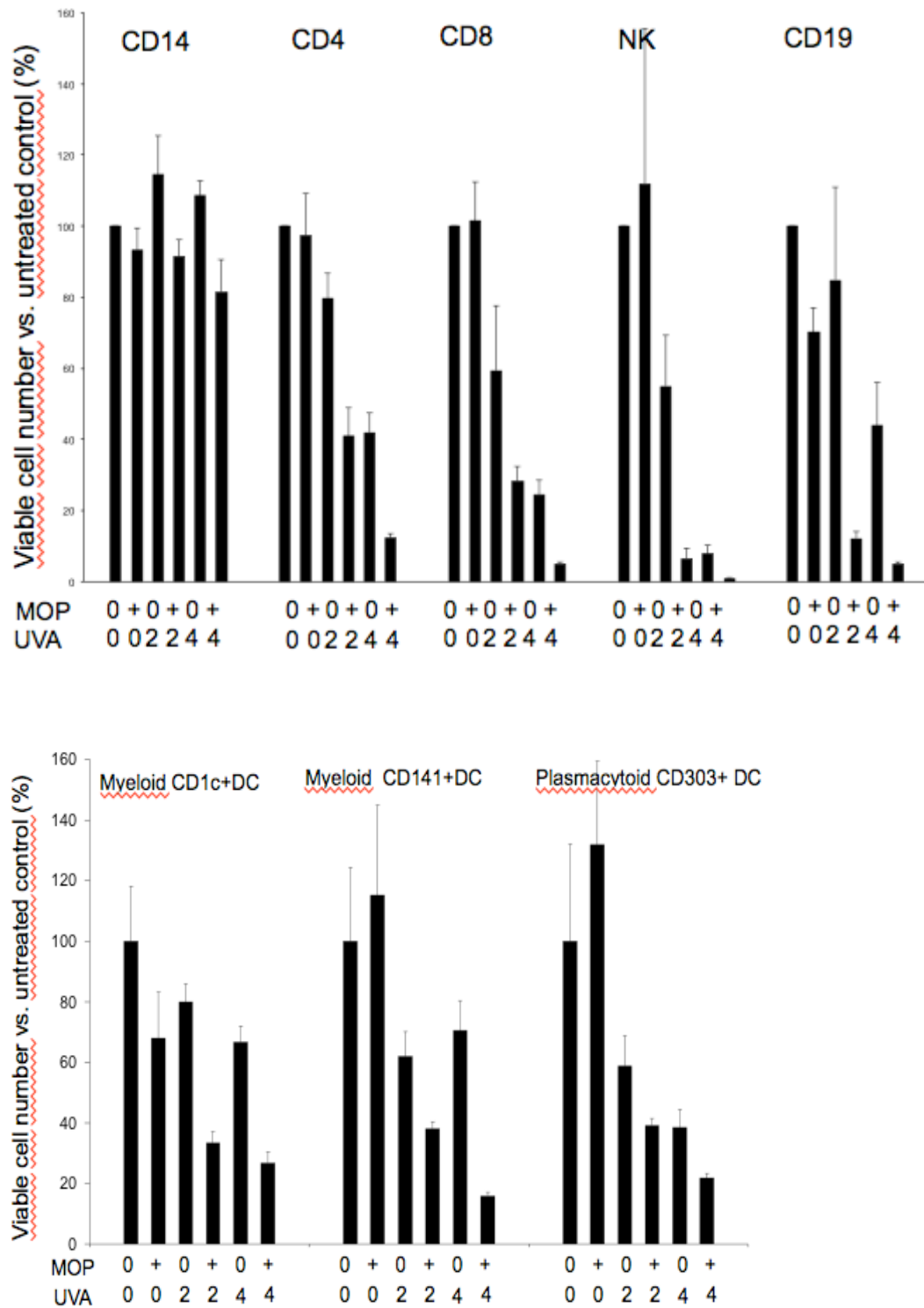
Um bestimmen zu können inwiefern die verschiedenen Bestrahlungsintensitäten, mit oder ohne 8-Methoxypsoralen, die einzelnen Zellpopulationen beeinflussen, legten wir jeweils die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle als 100% fest und betrachteten die Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen im Verhältnis zu dieser.

Bei den CD14 positiven Monozyten zeigte sich, dass es durch alleinige Bestrahlung mit einer Intensität von 2 bzw. 4J zu einem leichten Anstieg und durch vorherige Zugabe von 8-MOP nur zu einem geringen Abfall der Zellzahl kommt. Die Reaktion dieser Zellen auf die ECP scheint nach 48h also eher gering zu sein, die alleinige Bestrahlung wirkt eher noch stimulierend.

Betrachtet man die T-Lymphozyten, die mit einem Mix aus anti-CD3-, anti-CD8-, anti-CD45 und anti-CD4 gefärbt worden sind, so zeigt sich bei den CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen und den CD4-positiven T-Helferzellen ein sehr ähnliches Bild: die alleinige Bestrahlung mit 2J führt nur zu einem geringen Abfall der gemessenen Zellzahl, wohingegen die Bestrahlung mit 2J unter Zugabe von 400MOP, ebenso wie die alleinige Bestrahlung mit 4J zu einer weitaus stärkeren Reduktion der T-Lymphozyten führt. Die stärksten Auswirkungen auf deren Zellzahl übt die Kombination von UV-A Licht in der Stärke von 4J und 400MOP aus, von den zytotoxischen T-Zellen sind dann nur noch um die 15%, von den T-Helferzellen nur noch weniger als 10% übrig.

Die natürlichen Killerzellen sowie die B-Lymphozyten wurden mit einer Kombination aus anti-CD3, anti-CD16/CD56, anti-CD45 sowie anti-CD19-Antikörpern bestimmt. Die CD16/CD56 positiven, CD19 negativen NK-Zellen zeigten schon bei der alleinigen Bestrahlung mit 2J eine ziemlich deutliche Reduktion ihrer Zellzahl, bei der vorherigen Zugabe von 8-MOP sowie der Bestrahlung mit 4J wurden die NK-Zellen nahezu vollständig abgetötet. Die CD19 positiven B-Lymphozyten reagierten geringer auf die alleinige Bestrahlung mit 2J und auch bei 4J waren noch über 40% von ihnen vital. Bei vorheriger Zugabe von 8-MOP jedoch, kam es zu einer sehr starken Reduktion der B-Lymphozyten auf ca.10% bei 2J und einer noch stärkeren Reduktion auf unter 5% bei 4J.

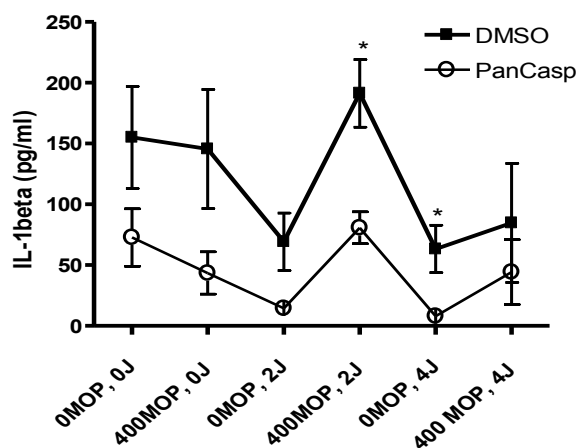
Bei den MDC1 (CD14-/CD19-/CD1c+) kommt es durch die Bestrahlung mit UVA-Licht bei beiden Intensitäten nur zu geringen Abfällen der Zellzahl, wurde jedoch MOP hinzugefügt, wird die Zellzahl deutlich reduziert. Bei den MDC2 (CD14-/CD19-/CD141+) zeigt sich ein sehr ähnliches Bild, wobei die alleinige Bestrahlung mit 2J schon eine etwas stärkere Verminderung der Zellzahl als bei den MDC1 zur Folge hat. Die plasmazytoiden DC (CD14-/ CD123+/CD304+/CD11c-) zeigen ebenfalls schon bei 2J/0MOP einen ziemlich starken Abfall auf ca.60%, bei Behandlung mit 4J/400MOP sinken sie auf ca. 20%.



**Abb. 4.11:** Die experimentelle Photopherese reduziert mit Ausnahme der CD14+Monozyten alle Zellpopulationen der untersuchten, unstimulierten PBMC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowie zur alleinigen Bestrahlung: CD14+ Monozyten, CD4+ und CD8+ T-Helfer-Zellen, CD19+ B-Lymphozyten, NK: Natürliche Killerzellen, CD1c+ Myeloische Dendritische Zellen, CD141+ Myeloische Dendritische Zellen, CD303+ Plasmazytäre Dendritische Zellen

#### 4.8 PanCaspase-Inhibitor führt zu einer erniedrigten Produktion von IL-1 $\beta$ und IL-18 nach experimenteller Photopherese in niedriger Bestrahlungsstärke

Im nächsten Schritt war es unser Ziel zu untersuchen, inwiefern die durch die experimentelle Photopherese hervorgerufene IL-1 $\beta$ -Produktion der PBMC, durch die Zugabe eines PanCaspase-Inhibitors beeinflusst werden kann. Dazu wurde 24h nach Photopherese der PanCaspase-Inhibitor, bzw. DMSO bei der Kontrollgruppe, zur Zellkultur gegeben. Nach einer Stunde Inkubation erfolgte die übliche Stimulation mit LPS/R848. Nach weiteren 24h Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen um diese im ELISA zu untersuchen. Vergleicht man die Menge des von der Kontrollgruppe produzierten IL1- $\beta$  mit dem von den Zellen zu denen der PanCaspase-Inhibitor hinzugefügt wurde, so zeigt sich durch die Zugabe des PanCaspase-Inhibitors in allen Gruppen ein Rückgang der IL-1 $\beta$  Produktion, der sich bei 400 MOP/2J und 0 MOP/4J als signifikant erweist.



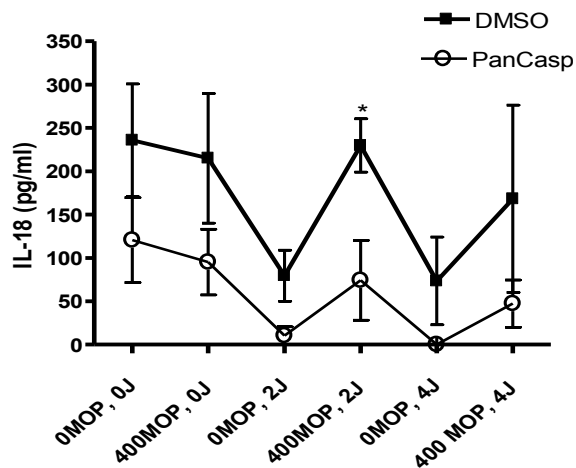
**Abb. 4.12:** Der PanCaspase-Inhibitor reduziert die nach experimenteller Photopherese mit 2J produzierte Menge an IL-1 $\beta$  signifikant.  $n=4$ , \*  $p < 0,05$ , one-way-Anova test + Tuckey's multiple comparison ( $\pm$  SE).

Zusätzlich zur IL1- $\beta$ -Produktion untersuchten wir die Wirkung des PanCaspase-Inhibitors auf die Produktion von IL-18. Die IL-18 Menge in der Kontrollgruppe wird durch die alleinige Bestrahlung deutlich reduziert, bei mit 400 MOP bestrahlten Zellen bleibt die Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konstant, bei 4J sinkt sie



weniger stark ab, als bei alleiniger Bestrahlung mit 4J, allerdings weisen diese Ergebnisse keine Signifikanz auf.

Bei der Zugabe des PanCaspase-Inhibitors lässt sich wiederum eine signifikante Reduktion der bei 400 MOP/2J produzierten IL-18 Menge darstellen.



**Abb. 4.13: Der PanCaspase-Inhibitor reduziert die nach experimenteller Photopherese mit 2J produzierte Menge an IL-18 signifikant.** PBMC nach Zugabe von PanCaspase-Inhibitor im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe.  $n=4$ , \*  $p < 0,05$ , one-way-Anova test + Tukey's multiple comparison ( $\pm$  SE).

## 5. Diskussion

Die extrakorporale Photopherese wird seit Jahren erfolgreich in der Klinik angewendet, z.B. zur Behandlung von T-Zell Lymphom, Graft-versus-host-disease, Transplantatabstoßung und Autoimmunkrankheiten [79]. Sie dient dabei sowohl der Immunstimulation beim kutanen T-Zell Lymphom, als auf der Entzündungshemmung bei GvHD. Doch trotz der erfolgreichen Anwendung dieser Therapie und zahlreicher Veröffentlichungen über ihre Wirkung bei den verschiedenen Erkrankungen, sowie den zahlreichen Untersuchungen auf zellulärer Ebene bleiben noch einige Fragen offen.

Wir verwendeten zur Validierung unserer Untersuchungen zum einen die Apoptoseinduktion, zum anderen die Proliferationshemmung von Lymphozyten. Unser Ziel war es herauszufinden, ob die experimentelle Photopherese auf alle Zellpopulationen des Immunsystems gleich wirkt oder ob es Unterschiede im Überleben der Zellen gibt. Nachdem wir feststellten, dass die Monozyten eher resistent gegenüber der Photopherese sind, wollten wir den Einfluss der Behandlung auf die Kostimulator-moleküle auf den Monozyten überprüfen. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss der ECP auf die Zytokinproduktion sowohl von PBMC als auch von isolierten Monozyten.

### 5.1. Selektive Apoptoseinduktion durch die Bestrahlung mit UVA

Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, wird die Apoptose von PBMC durch die alleinige Bestrahlung mit UVA ab einer Bestrahlungsintensität von  $2\text{J}/\text{cm}^2$  induziert [46]. Die alleinige Gabe von 8-Methoxypsoralen führt zu keiner Apoptoseinduktion, gibt man 8-MOP vor der Bestrahlung zu der Zellkultur hinzu, lässt sich kein signifikanter Effekt gegenüber den ohne 8-MOP bestrahlten Zellen feststellen [46]. Zu demselben Schluss kamen wir bei unserer Untersuchung der Apoptoseinduktion von PBMC. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Apoptose in ECP-behandelten Leukozyten in der Frühphase durch eine gestörte Mitochondrienfunktion und einen Anstieg der Phosphatidylserin Exposition auf der Zelloberfläche eingeleitet wird [100], während die späte Apoptose, 24h nach der Behandlung, durch die Aktivierung der Caspasen-Kaskade ausgelöst wird [101]. *In vivo* würden die eingeleiteten apoptotischen Prozesse eine Phagozytose der Mehrheit der ECP-behandelten Lymphozyten innerhalb 48h zur Folge haben [101]. Um herauszufinden ob die experimentelle Photopherese auf Lymphozyten, Monozyten und Dendritische Zellen gleich wirkt, haben wir die unterschiedlichen Zellpopulationen vor und nach der Photopherese in den

unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten untersucht und dabei festgestellt, dass es Unterschiede im Grad der Apoptoseinduktion durch die experimentelle Photopherese gibt. Während es bei den T- und B-Lymphozyten, den NK-Zellen und Dendritischen Zellen zu einer eindeutigen Reduktion der Zellzahl in Abhängigkeit von der Intensität der Bestrahlung und der Anwesenheit von 8-MOP kommt, scheinen die CD14+ Monozyten relativ resistent gegenüber der Photopherese zu sein, unter der Anwesenheit von 8-MOP verändert sich ihre Zellzahl kaum. Auch in der Arbeit von Yoo et al. [46] wurde diese Beobachtung gemacht. Zudem konnte die Gruppe zeigen, dass nach Photopherese die Fähigkeit der Monozyten zunimmt, apoptotische T-Zellen zu phagozytieren. Diese Erkenntnisse werden durch Untersuchungen unterstützt bei denen Patienten 1, 6 und 24h nach Reinfusion der behandelten Zellen getestet wurden und keine apoptotischen Lymphozyten zu finden waren [46]. Darüber hinaus konnten Berger et al. [70] zeigen, dass die Monozyten nicht nur resistenter gegenüber der ECP sind, sondern durch die Behandlung eine Differenzierung zu CD14-/ CD83+/CD36+ Dendritischen Zellen erfolgt, die die malignen apoptotischen T-Zellen phagozytieren [70].

## **5.2. 8-MOP spielt eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit der ECP**

Auch wenn man den Effekt der experimentellen Photopherese auf die Zytokinproduktion betrachtet, stellt man bei den von uns untersuchten Zytokinen IL-12p70 und INF- $\gamma$  fest, dass es keine Rolle spielt ob zu den bestrahlten Zellen zuvor 8-Methoxypsoralen hinzugefügt wurde oder nicht, die Bestrahlung alleine ist der entscheidende Faktor, der zur Supprimierung ihrer Produktion führt. So stellt sich die Frage ob die Bestrahlung mit UVA nicht ausreichend ist und wozu man das 8-MOP überhaupt benötigt.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir viele Wirkmechanismen, die sich durch die experimentelle Photopherese erzielen ließen, nur in der Anwesenheit dieses Wirkstoffes beobachten. Eine signifikante Hemmung der IL-10 und IL-6 Produktion ließ sich nur bei den PBMC bzw. Monozyten beobachten, zu denen vor der Bestrahlung 8-MOP gegeben wurde. Bei den Interleukinen IL-2 und IL-5 kam es bei einer Bestrahlungsstärke von  $2\text{J}/\text{cm}^2$  nur in Anwesenheit von 8-MOP zur einer signifikanten Supprimierung. Auch der durch die Photopherese induzierte Anstieg der Oberflächenexpression von Kostimulator-molekülen auf Monozyten erfolgte vor allem in der Anwesenheit von 8-Methoxypsoralen. Über 8-Methoxypsoralen sind folgende Eigenschaften bekannt: es ist nur aktiv in der Anwesenheit von UVA, wodurch seine

Wirkung sehr gut steuerbar und präzise ist; es initiiert die Apoptose von malignen Lymphozyten und führt zu einem Anstieg der Antigenprozessierung und Präsentation an MHC-I Molekülen durch die exponierten Zellen [70]. Ungefähr 50% der Photoaddukte von 8-MOP, die durch die UVA-Exposition geformt werden, befinden sich außerhalb des Zellkerns. Durch die chemische Bindung an aromatische Aminosäuren von zytoplasmatischen Proteinen sowie Lipidbestandteilen der Zellmembran können diese modifiziert werden. Hanlon et al. [102] konnten bei ihren Untersuchungen von humanen B-lymphoblastoiden Zellen zeigen, dass eine Behandlung mit 8-MOP zu einem >200%igem Anstieg der Expression von MHC I auf der Zelloberfläche führt und dass dieser Anstieg durch die Inhibierung des Peptidtransportes gehemmt werden kann. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass 8-MOP einen direkten Einfluss auf die Prozessierung und die Präsentation von Antigen-Peptiden nimmt [102]. Diese und weitere Beobachtungen in unseren Ergebnissen und die jahrelangen klinischen Erfahrungen sprechen für die essentielle Notwendigkeit der Verwendung von 8-MOP in der Extrakorporalen Photopherese.

### **5.3. Proliferationstest besser zur Validierung geeignet**

Die Tatsache, dass 8-Methoxypsoralen für viele Wirkmechanismen der ECP von essentieller Bedeutung ist, macht den Proliferationstest zu einer besseren Validierungsmethode als die Apoptosemessung mit Annexin V und 7-AAD. Bei der Induktion der Apoptose durch die experimentelle Photopherese lässt sich durch die vorherige Zugabe von 8-MOP zur Zellkultur kein signifikanter Unterschied zwischen der Vitalität dieser Zellen und derer, die mit der gleichen Bestrahlungsintensität, aber ohne den Wirkstoff bestrahlt worden sind, feststellen. Im Gegensatz dazu, führt die Anwesenheit von 8-MOP während der Bestrahlung mit UVA im Proliferationstest zu einem signifikanten Rückgang der BrdU-Inkorporation. Dadurch, dass dieser Wirkstoff zur Proliferationshemmung der PBMC notwendig ist, eignet sich der einfache Test bestens zur Überprüfung des Settings um eventuelle Fehlerquellen auszuschließen, bevor weitere Experimente durchgeführt werden. Da zuvor noch kein Protokoll zur Validierung der ECP bestand, etablierten Jacob et al. [79] 2003 die „Inhibierung von Mitogen-induzierter Proliferation“ als solches. Beim Proliferationstest macht man sich die Eigenschaft des 8-MOP zu Nutze, kovalente Bindungen mit den Pyrimidin-Basen der DNA einzugehen, welche zur Inhibierung der Zellproliferation und damit zum Zelltod führt. In ihren Untersuchungen stellten sie fest, dass die ECP, unabhängig von der Pathologie des jeweiligen Patienten, in 94% der Fälle zu einer über 90%igen

Hemmung der Proliferation führt. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit der behandelten Leukozyten eine sehr gut Validierungsmöglichkeit darstellt [79].

### **5.3 Die ECP aktiviert Monozyten**

Die Monozyten sind nicht nur resistenter gegenüber der ECP und gehen weniger in Apoptose, sondern werden durch diese sogar aktiviert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die experimentelle Photopherese zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von CD40, CD80, CD86 und HLA-DR gegenüber der Kontrollgruppe führt. Durch den Anstieg von CD40 können vermehrt Monozyten aktiviert werden, wodurch diese ihre Expression von CD80/86 erhöhen und somit das Wachstum und die Differenzierung von weiteren Monozyten, sowie B-Lymphozyten fördern können. Der Anstieg von CD80 und CD86 führt über die Bindung an CD28 auf T-Zellen zu einer erhöhten IL-2 Produktion und somit zu einer T-Zell Proliferation [26]. Auch die verstärkte Expression von HLA-DR, hat über die Induktion einer vermehrten Antigenpräsentation eine T-Zellaktivierung zur Folge.

### **5.4 ECP supprimiert und stimuliert Zytokinproduktion**

Der immunmodulatorische Effekt der ECP auf die Zytokinproduktion der unterschiedlichen Immunzellen, wie Keratinozyten, Lymphozyten, Monozyten und Endothelzellen wurde vielfach untersucht. Die Mehrheit der Daten haben eine durch Kombination von 8-Methoxypsoralen und UVA verursachte Reduktion der Zytokinproduktion ergeben, die sich am wahrscheinlichsten durch die Schädigung der Zelle und ihren damit eingeleiteten Untergang, erklären lässt. Allerdings zeigten andere Ergebnisse, dass eine Photopherese in niedrigen Dosen zu einer Stimulation von T-Zellen geführt hatte, die daraufhin Th1-Zytokine wie INF- $\gamma$  produzierten. Man nimmt an, dass sowohl die Inhibierung, als auch die Stimulation der Zytokinproduktion einen Teil des therapeutischen Effekts der ECP ausmachen.

IL-2 ist ein wichtiges, von T-Zellen produziertes, Zytokin auf dessen Beeinflussbarkeit durch die ECP ein besonderes Augenmerk gerichtet wurde. Diese Studien haben ergeben, dass die experimentelle Photopherese zu einem starken Rückgang der IL-2 Produktion sowohl von PBMC als auch von isolierten T-Zellen, unabhängig von der 8-MOP- oder UVA-Dosis, führt [77]. Unsere Untersuchungen zeigten, dass die IL-2 Produktion von PBMC (stimuliert mit CD3/CD28), durch die Bestrahlung von 2J in

Kombination mit 8-MOP signifikant reduziert wird, bei 4J spielt die 8-Methoxypsoralen Zugabe nur noch eine unbedeutende Rolle.

Von der Hypothese ausgehend, dass die ECP das Verhältnis von Th2- zu Th1-Zellen beeinflusst, untersuchten wir des weiteren das Th1-spezifische Interferon- $\gamma$  und das von Th2-Zellen sekretierte IL-5 und IL-10. Das von mit CD3/CD28 stimulierten PBMC produzierte INF- $\gamma$  wurde durch die experimentelle Photopherese in allen Gruppen signifikant reduziert. Bei den mit LPS/R848 stimulierten PBMC kam es ebenfalls zur Reduktion von INF- $\gamma$  in allen bestrahlten Gruppen, allerdings war diese, bei 2J/400MOP weniger stark als in den anderen Gruppen. Einen in der Arbeit von Tokura et al. [77] beschriebenen Anstieg von INF- $\gamma$  nach ECP konnten wir somit nicht bestätigen, allerdings wurde dieser bei einer Bestrahlungsintensität von  $1\text{J}/\text{cm}^2$  beobachtet, welche wir nicht untersucht haben. Darüber hinaus hatte die Gruppe einen durch die ECP induzierten Anstieg der mRNA für IFN- $\gamma$  und IL-2 beobachtet, während die mRNA für IL-4 und IL-10 reduziert wurde [77]. Dies wiederum korreliert mit unseren Ergebnissen, dass die experimentelle Photopherese einen Abfall der Th2-spezifischen Interleukine IL-5 und IL-10 herbeiführt, der in beiden Fällen nur bei Kombination von Bestrahlung und 8-MOP signifikant ist.

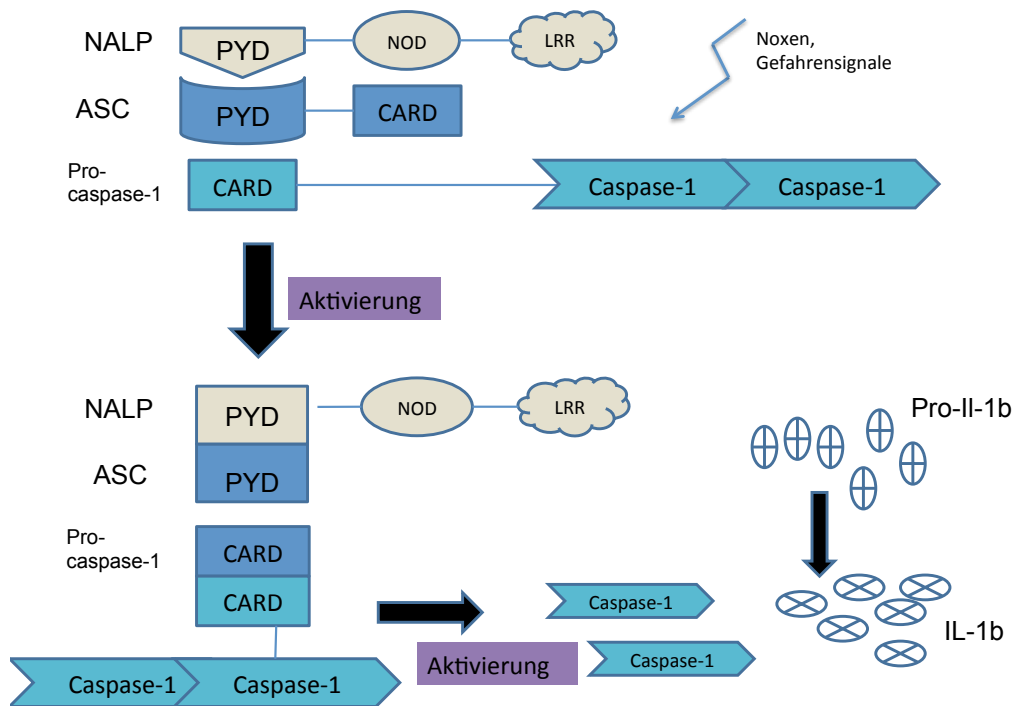
Bohencke et al. [103] untersuchten den Effekt der ECP auf die Sekretion von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6. Dazu verwendeten sie frisch isolierte PBMC von Psoriasis-Patienten vor und nach der Behandlung und kamen zu dem Schluss, dass die Photopherese die Sekretion aller drei Zytokine reduziert, am stärksten die von IL-6 [103]. Dies konnten wir in unseren Untersuchungen nur teilweise bestätigen. Die IL-6 Produktion von LPS/R848-stimulierten PBMC wurde durch die Photopherese signifikant supprimiert, ebenso verhielt es sich bei IL-12p70. Überraschenderweise konnten wir jedoch bei IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei einer Bestrahlungsintensität von  $2\text{J}/\text{cm}^2$  in Kombination mit 8-MOP eine Stimulation der jeweiligen Zytokinproduktion beobachten, die sich bei IL-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ) als hochsignifikant erwies. Aufgrund der Beobachtung, dass während der Behandlung des CTCL durch die Extrakorporale Photopherese in der frühen Behandlungsphase häufig Fieber auftritt, und im Anschluss die „anti-Tumor“ Antwort zu beobachten ist, untersuchten auch Vowels et al. [66] die Auswirkung der ECP auf die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Sie stellten einen signifikanten Anstieg der TNF und IL-6, jedoch keine Veränderung der IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion fest [66]. Andere Veröffentlichungen beschreiben eine Supprimierung von IL-1 durch die ECP: Tokura et al. [104] wiesen eine Reduktion der IL-1 Produktion von murinen epidermalen Keratinozyten nach, allerdings verwendeten sie 8-MOP Konzentrationen zwischen 5 und 100ng und lediglich eine Bestrahlungsintensität von

1J/cm<sup>2</sup> [104]. Somit konnten wir zum ersten Mal eine bis dahin unbekannte Stimulation der IL-1 $\beta$  Produktion durch die experimentelle Photopherese nachweisen. Außerdem untersuchten wir die IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-10 Produktion von isolierten Monozyten, die mit denen der PBMC korreliert.

### 5.5 Führt die ECP zur Induktion des Inflammasoms?

Wie bereits berichtet, spielt das Caspasesystem eine wichtige Rolle in der Apoptoseeinleitung der Lymphozyten nach extrakorporaler Photopherese. Caspasen sind Cysteiny-Aspartat-Proteinasen, also Cystein-Proteasen, die ihre Substrate nach einem Aspartat-Rest spalten [105]. Caspase-1 wurde zunächst als Interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme (ICE) bekannt, da es für die Reifung von IL-1 $\beta$  notwendig ist [106]. Als Caspase-Zymogene werden die inaktiven Vorläufer der Caspasen bezeichnet, die sich in beinahe allen gesunden Zellen des Körpers befinden [105]. Aktivierte Caspasen können in zwei Untergruppen unterteilt werden: die Caspasen der einen Gruppe besitzen eine lange Prodomäne und führen aktiviert durch Apoptosesignale zu ihrer eigenen autokatalytischen Aktivierung. Sie stellen also das Bindeglied zwischen dem Signal und der Ausführung der Apoptose dar. Aus diesem Grund werden sie als Initiatorcaspasen bezeichnet. Ihre wichtigsten Vertreter sind Caspase-1, -8, -9 und -10 [107]. Die anderen, mit der kurzen Prodomäne besitzen keine Fähigkeit zur Selbstaktivierung, sie können lediglich von den aktivierten Initiator-Caspasen aktiviert werden. Deshalb werden sie als Effektorcaspasen bezeichnet (Caspase-3, -6, -7) [107].

Neben den proapoptotischen Caspasen gibt es auch proinflammatorische Caspasen wie Caspase-1, -4 und -5. Caspase-1 und Caspase-5 sind jeweils Bestandteil des Inflammasoms. Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex im Zytosol von Makrophagen und Neutrophilen, der Caspase-1 bzw. Caspase-5 aktiviert. Dies führt zur Spaltung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18. Es wurden verschiedene Typen des Inflammasoms beschrieben, die bekanntesten sind NALP1 und NALP3. Das NALP3 Inflammasom besteht aus NALP3 (NACHT, LRR und einer Pyrin-Domäne), dem Adaptor-Protein ASC und Caspase-1 und besitzt eine Schlüsselfunktion in der Aktivierung der Caspase-1 und somit in der Ausschüttung von IL-1 $\beta$ (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: Aktivierung des Inflammasoms**, PYD: Aminoende, NACHT: Nucleotid- Bindungs und Oligomerisierungs-Domäne, LRR: Domäne mit Leukocin-reichen Wiederholungen, ASC: apoptosis-associated specklike protein mitcaspase-recruitment domain (CARD) und Caspase-1. Modifiziert nach [108]

Durch sogenannte „Gefahrensignale“ ,dazu gehören z.B. LPS, ATP oder eine Schädigung der Zelle, kommt es zu einer Selbstoligomerisierung des NALP3; über die Interaktion der homotopen NACHT-Domäne wird ein Komplex mit einem höheren Molekulargewicht gebildet, der die Caspase-1 Autoaktivierung triggert. Das durch die Caspase-1 frei gewordene IL-1 $\beta$  leitet daraufhin die Entzündungskaskade ein. [108],[109]. Um herauszufinden, ob das Inflammasom bei der IL-1 $\beta$  Induktion durch die Photopherese eine Rolle spielt, haben wir den Einfluss von Caspase-Inhibitoren (PanCaspase-Inhibitor) untersucht. Dabei stellten wir fest, dass der PanCaspase-Inhibitor bei Photopherese mit 2J/cm<sup>2</sup> zu einer signifikanten Reduktion sowohl der IL-1 $\beta$  als auch der IL-18 Produktion führt, wenn man diese mit der Produktion von Zellen vergleicht, die ohne den Inhibitor bestrahlt wurden.

IL-1 $\beta$  und IL-18 sind wichtige Zytokine der angeborenen Immunität, welche die Entstehung einer spezifischen T-Zell-Immunantwort triggern. IL-1 $\beta$  wird z.B. für die Entstehung einer Kontakt-Hypersensitivität nach Trinitrochlorobenzen-Exposition



(TNCB) verantwortlich gemacht. Nach TNCB-Applikation kann man in den Zellen der Haut eine Hochregulation der mRNA für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  beobachten, wobei die IL-1 $\beta$  mRNA als erste, innerhalb 15 min nach Exposition ansteigt. Bei IL-1 $\beta$  defizienten Mäusen, entsteht keine Hypersensitivitäts-Reaktion nach Exposition zu derselben Dosis TNCB [110]. Die Stimulation der IL-1 $\beta$  Produktion ist an der Regulation einer effizienten Langerhanszell Migration und Antigenproduktion ebenso beteiligt, als auch an der Rekrutierung von *geprimten* Lymphozyten in die Haut.

Da Antonopoulos et al. [111] herausgefunden hatten, dass für eine optimale Langerhanszell Migration und optimale Induktion einer Kontakt-Hypersensitivität in Mäusen eine funktionelle Caspase-1 notwendig ist, haben mehrere Arbeitsgruppen die Rolle des Inflammasoms bei der Entstehung der spezifischen T-Zell-Immunantwort untersucht. Watanabe et al. [112] konnten zeigen, dass das Inflammasom in Keratinozyten und von Monozyten abstammenden Zellen anwesend ist und auch aktiviert werden kann. ASC- und NALP3- defiziente Mäuse wiesen eine reduzierte Überempfindlichkeitsreaktion auf TNCB auf und zeigten damit, dass das Inflammasom eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Kontakt-Hypersensitivität besitzt. Somit kommt, zumindest ein Teil, der notwendigen pro-inflammatorischen Signale, die für das T-Zell *Priming* notwendig sind, vom Inflammasom [112].

Damit es zu keiner überschießenden Immunreaktion kommt muss es auch Faktoren geben, die das Inflammasom inhibieren können. Man hat herausgefunden, dass CD4+ Effektor-Zellen und T-Gedächtniszellen über Zell-Zell-Kontakte, vermittelt durch Zellliganden aus der TNF-Familie wie z.B. CD40L bei Mäusen eine Supprimierung von NALP1 und NALP3 hervorrufen [113]. Es wäre naheliegend, dass über diesen Weg die angeborene Immunantwort „ausgeschaltet“ wird, sobald die erworbene Immunantwort eingeleitet worden ist. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass es trotz der Inflammasomaktivierung durch die ECP nicht zu einer überschießenden Immunantwort kommt [109].

## 5.6 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die extrakorporale Photopherese ist eine etablierte und effektive Therapie für viele Erkrankungen [41], doch es bleiben noch viele Fragen über ihren genauen Wirkmechanismus offen. Wir haben zum einen festgestellt, dass die ECP die TNF- $\alpha$  Sekretion sowohl von PBMC als auch von Monozyten stimuliert. Aus der Literatur kann man entnehmen, dass TNF- $\alpha$  die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen induziert, aber auch direkte Anti-Tumoreffekte besitzt [66]. Dies könnte zum Behandlungserfolg

beim CTCL beitragen. Desweiteren supprimiert es die Kollagensynthese und stimuliert die Kollagenaseproduktion, was eine Erklärung für die Wirksamkeit der ECP bei Systemischer Sklerose sein könnte [66].

Wie Hanlon et al. [102] berichten, hängt die Wirksamkeit der ECP zum Teil auch von der Steigerung der Immunogenität der Tumor- und auch der Antigenpräsentierenden Zellen, also der Fähigkeit dieser Zellen eine Immunantwort hervorzurufen, ab, denn die ECP führt zu einem Anstieg der MHC I Expression um 200-300% [102]. Wir konnten eine durch die ECP ausgelöste Steigerung der Kostimulator-moleküle CD40, CD80, CD86 und HLA-DR (MHC II) auf Monozyten nachweisen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Hypothese von Heshmati et al. [45] dass durch die ECP aktivierte Dendritische Zellen entstehen, die die apoptotischen Zellen phagozytieren und durch eine Hochregulation von MHCII, zusammen mit CD40 CD4+ T-Helferzellen stimulieren. Darüber hinaus erfolgt auch eine Hochregulation von MHCI, durch welches CD8+ zytotoxische T-Zellen stimuliert werden und somit eine zytotoxische Antwort gegen den malignen CTCL-Klon entsteht [45].

Über IL-10 ist bekannt, dass es eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort und Entzündungsreaktion spielt [114]. Es hemmt die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  und führt gleichzeitig zu einer Reduktion der Oberflächenexprimierung von MHCII, CD80 und CD86, und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf Monozyten. Damit inhibiert IL-10 die Monozyten, eine T-Zell Antwort auszulösen [114],[115]. IL-10 wirkt also genau gegenteilig zur ECP-Wirkung auf die Monozyten. Da wir einen signifikanten Abfall der IL-10 Produktion durch die ECP zeigen konnten, könnte dies eine weitere Komponente sein, die zum Wirkmechanismus der ECP beiträgt.

Wir konnten, soweit uns bekannt, zum ersten Mal nachweisen, dass die ECP zu einer ausgeprägten Produktionssteigerung des proinflammatorischen Zytokines IL-1 $\beta$  führt. Da IL-1 $\beta$  unter anderem das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen beeinflusst [30], könnte es eine wichtige Rolle bei der durch die ECP induzierten Entstehung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen gegen den malignen T-Zell Klon spielen.

Unsere Ergebnisse, sowie Daten aus der Literatur zeigen [108], [109], dass die Produktionssteigerung von IL-1 $\beta$  durch das Inflammasom reguliert wird; viele Reaktionen, die IL-1 $\beta$  abhängig sind, sind auch Caspase-1 abhängig. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung eines Caspaseinhibitors zur Reduktion der ECP induzierten Produktionssteigerung von IL-1 $\beta$  und IL-18 führt. Für die Zukunft wird

es eine wichtige Rolle spielen, das Inflammasom biochemisch genauer zu charakterisieren um Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapieformen zu finden. In unserer Arbeit werden neue Aspekte des Wirkmechanismus der ECP aufgezeigt. Man könnte kritisieren, dass die Bestrahlung mit UVA nur in bestimmten Intensitäten durchgeführt wurde, andere Gruppen haben z.B. eine Bestrahlungsintensität von  $1\text{J}/\text{cm}^2$  verwendet [77]. Zum anderen wäre es interessant herauszufinden, ob durch die extrakorporale Photopherese noch weitere Zytokine stimuliert werden, um so ihren Wirkmechanismus noch besser zu verstehen zu können.

Eine weitere Möglichkeit wäre es, am Tiermodell zu untersuchen, ob 8-Methoxypsoralen für die GvHD-Behandlung essentiell ist und wie es Behandlungserfolg der ECP beeinflusst.

## 6. Summary

Extracorporeal photopheresis represents an important cellular therapy that is used successfully for treatment of cutaneous T cell cancer, organ allograft rejection and graft versus host disease. Many reports have focused on immunoregulatory activity of ECP, but little is known regarding immunostimulatory effects of ECP. Here we have revealed a novel immunostimulatory activity of ECP.

After experimental ECP with human peripheral blood mononuclear leukocytes we have analysed systematically the modulation of T-cell derived cytokines after CD3/CD28 mAb stimulation and antigenpresenting cell-derived cytokine production after LPS/R848 (TLR4/7/8) stimulation. Survival of all major leukocyte subsets including T, B, NK lymphocytes, monocytes and dendritic cells subsets was quantitated by multiparameter flow cytometry.

ECP abrogated efficiently over 90% of the IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 and IFN- $\gamma$  production after T-cell or antigen presenting cell stimulation. In contrast, ECP markedly enhanced PBMC-derived immunostimulatory IL-1 $\beta$  production (>4-6 fold elevation; n=8; p<0.0001) at clinically relevant UVA ( 2 J/cm<sup>2</sup>) and 8-Methoxypsoralen (400 ng/ml) conditions. IL-1 $\beta$  induction was not a result of passive release or cell death since irradiation with higher UVA-doses was unable to increase IL-1 $\beta$  levels. Analysis of the surviving cell types after ECP by multiparameter flow cytometry revealed that all lymphocyte subsets as well as myeloid and dendritic cell subsets went into apoptosis after ECP. In contrast, ECP promoted almost unaffected survival of CD14+ monocyte subsets (viability >80%). ECP experiments with highly purified human monocytes represent the cellular source of IL-1 $\beta$ .

Here we have identified a novel immunostimulatory pathway that is triggered by ECP in viable human monocytes. ECP-mediates induction of the prototypic activatory cytokine IL-1 $\beta$  may provide novel insight into the reported clinical activity of ECP for cancer therapy.

## 7. Zusammenfassung

Die Extrakorporale Photopherese spielt eine wichtige Rolle als Therapie auf zellulärer Ebene bei der Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms, Transplantat Abstoßungs-Reaktionen und Graft versus host disease. Viele Arbeiten haben sich mit der immunregulatorischen Funktion der ECP beschäftigt, aber nur wenig ist über die immunstimulatorischen Auswirkungen dieser Therapie bekannt. Wir konnten in unserer Arbeit zum ersten Mal eine bisher unbekannte immunstimulatorische Aktivität der ECP zeigen.

Wir untersuchten die Modulation der Zytokinproduktion von T-Lymphozyten und Antigenpräsentierenden Zellen nach Behandlung mit Experimenteller Photopherese. Dazu stimulierten wir im Anschluss die T-Zellen mit CD3/CD28 mAb und die APCs mit LPS/R848 (TLR 4/7/8). Zum anderen untersuchten wir die Unterschiede im Überleben von T-, B- und NK-lymphozyten, Monozyten und Dendritischen Zellen nach ECP mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Die ECP führt sowohl bei T-Zellen, als auch bei APCs zu einer effizienten Supprimierung der IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- $\gamma$  Produktion. Im Gegensatz dazu erhöht die ECP signifikant die durch PBMC produzierte IL-1 $\beta$  Menge ( $>4$ - $6$  fache Steigerung,  $n=8$ ,  $p<0,001$ ) unter klinisch relevanten Behandlungsbedingungen mit einer UVA-Dosis von  $2\text{J}/\text{cm}^2$  und 8-Methoxypsoralen in einer Konzentration von  $400\text{ ng/ml}$ . Wir konnten nachweisen, dass die IL-1 $\beta$  Freisetzung nicht aufgrund einer passiven Freisetzung, oder durch den Zelltod der bestrahlten Zellen erfolgte, da eine höhere UVA-Dosis keinen Anstieg der IL-1 $\beta$  Produktion gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe bewirkte. Die Untersuchung des Überlebens der einzelnen Zellpopulationen nach ECP zeigte, dass alle Lymphozyten-Untergruppen ebenso wie myeloische und Dendritische Zellen nach der ECP in Apoptose gehen, während das Überleben von CD14 $^+$  Monozyten mit einem Anteil von vitalen Zellen  $>80\%$  nahezu unbeeinflusst von der Therapie blieb. Die Ergebnisse nach ECP bei gereinigten Monozyten (Reinheit  $>95\%$ ) korrelierten mit den Ergebnissen nach Behandlung von PBMC und zeigten ebenso einen Anstieg der IL-1 $\beta$  Induktion ( $n=4$ ,  $p<0,001$ ). Somit stellen sehr wahrscheinlich die Monozyten die Quelle der IL-1 $\beta$  Produktion dar.

In unserer Arbeit haben wir einen neuen immunstimulatorischen Signalweg identifiziert, der durch die ECP in humanen Monozyten induziert wird. Die Induktion von IL-1 $\beta$ , das einen Prototyp für ein aktivierendes Zytokin darstellt, könnte einen neuen Einblick in die klinische Wirksamkeit der ECP bei Tumorerkrankungen geben.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen Präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
CD	Cluster of differentiation
CSF	colony-stimulating-factor
CTCL	cutaneous T-cell-lymphoma
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	extrakorporeale Photopherese
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
FDA	Food and drug administration
FITC	Fluorescein
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	colony stimulating factor
GM-EA	granulomonopoietic-enhancing-activity
GVHD	Graft-versus-host-disease
HCDM	Human Cell Differentiation molecules
HLA	Human leukocyte antigen
HLDA	Human Leucocyte Differentiation Antigens
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
mDC	myeloid dendritische Zellen
MF	Mycosis fungoides
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen

PBMC	peripheral blood mononuclear cells
pDC	plasmozytoide dendritische Zellen
PE	Phyoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PGE	Prostaglandin E
PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
PUVA	Psoralen plus UV-A
R848	Resiquimod
SSC	Side Scatter
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNCB	Trinitrochlorobenzen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
UV	Ultraviolettstrahlung
7-AAD	7-Amino-actinomycin
8-MOP	8-Methoxypsoralen

## 9. Literaturverzeichnis

- 1 *Santiago-Schwarz F.* Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 66(2): 209 – 216
- 2 *Robbins SL, Cotran RS, Kumar V.* Pathologic basis of disease. 8. Aufl. Philadelphia PA: Saunders Elsevier, 2010
- 3 *Iwasaki A, Medzhitov R.* Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963): 291 – 295
- 4 *Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.* Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783 – 801
- 5 *Trinchieri G.* Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994; 84(12): 4008 – 4027
- 6 *Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med* 1996; 184(2): 695 – 706
- 7 *Banchereau J, Briere F, Caux C et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 2000; 18: 767 – 811
- 8 *Geissmann F, Jung S, Littman DR.* Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19(1): 71 – 82
- 9 *Janeway C, Murphy KP.* Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl, 2009
- 10 *Morel F, Doussiere J, Vignais PV.* The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem* 1991; 201(3): 523 – 546
- 11 *Wang SY, Mak KL, Chen LY, Chou MP, Ho CK.* Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions. *Immunology* 1992; 77(2): 298 – 303
- 12 *Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA.* Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 1999; 11(6): 753 – 761
- 13 *McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM et al.* Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* 1996; 184(6): 2429 – 2432
- 14 *Kobayashi Y.* Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. *Immunology* 1997; 90(4): 496 – 501



- 15 Hashimoto S, Suzuki T, Dong HY, Nagai S, Yamazaki N, Matsushima K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 1999; 94(3): 845 – 852
- 16 Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol* 2005; 5(4): 296 – 306
- 17 Shin T, Kennedy G, Gorski K et al. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *J. Exp. Med.* 2003; 198(1): 31 – 38
- 18 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 1996; 184(2): 747 – 752
- 19 Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol* 1991; 9: 271 – 296
- 20 Wysocka M, Zaki MH, French LE et al. Sézary syndrome patients demonstrate a defect in dendritic cell populations: effects of CD40 ligand and treatment with GM-CSF on dendritic cell numbers and the production of cytokines. *Blood* 2002; 100(9): 3287 – 3294
- 21 Zola H. Medical applications of leukocyte surface molecules--the CD molecules. *Mol. Med.* 2006; 12(11-12): 312 – 316
- 22 Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med* 1994; 180(4): 1263 – 1272
- 23 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* 1993; 178(2): 669 – 674
- 24 Korthäuer U, Graf D, Mages HW et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412): 539 – 541
- 25 Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 1994; 180(2): 631 – 640
- 26 van Gool SW, Vandenberghe P, Boer M de, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol. Rev.* 1996; 153: 47 – 83

- 27 *Schweitzer K, Mayr GW, Guse AH.* Assay for ADP-ribosyl cyclase by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 2001; 299(2): 218 – 226
- 28 *Peter S. Linsley JLGWBJBJALRP.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; 1(9): 793 – 801
- 29 *Kelley VE, Fiers W, Strom TB.* Cloned human interferon-gamma, but not interferon-beta or -alpha, induces expression of HLA-DR determinants by fetal monocytes and myeloid leukemic cell lines. *J. Immunol.* 1984; 132(1): 240 – 245
- 30 *Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T.* Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 1990; 4(11): 2860 – 2867
- 31 *Durum SK, Schmidt JA, Oppenheim JJ.* Interleukin 1: an immunological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 1985; 3: 263 – 287
- 32 *Beutler B, Cerami A.* The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv. Immunol.* 1988; 42: 213 – 231
- 33 *Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M.* Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68(6): 897 – 902
- 34 *Jouanguy E, Döffinger R, Dupuis S, Pallier A, Altare F, Casanova JL.* IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11(3): 346 – 351
- 35 *Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M.* Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 1998; 187(12): 2103 – 2108
- 36 *Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T et al.* IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.* 1997; 158(4): 1541 – 1550
- 37 *Pizarro TT, Michie MH, Bentz M et al.* IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J. Immunol.* 1999; 162(11): 6829 – 6835
- 38 *Parrish JA, Fitzpatrick TB, Tanenbaum L, Pathak MA.* Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 1974; 291(23): 1207 – 1211

- 39 *Edelson R, Berger C, Gasparro F et al.* Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N. Engl. J. Med* 1987; 316(6): 297 – 303
- 40 *Heald P, Rook A, Perez M et al.* Treatment of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photochemotherapy. *J. Am. Acad. Dermatol* 1992; 27(3): 427 – 433
- 41 *Knobler R, Barr ML, Couriel DR et al.* Extracorporeal photopheresis: past, present, and future. *J. Am. Acad. Dermatol* 2009; 61(4): 652 – 665
- 42 *Cridland NA and Saunders RD.* Cellular and molecular effects of UVA and UVB. Norwich:HMSO, 1994
- 43 *FAHMY IR, ABU-SHADY H.* Ammi majus Linn.; pharmacognostical study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin. *Q J Pharm Pharmacol* 1947; 20(3): 281-91; discussion 426
- 44 *Marshall SR.* Technology insight: ECP for the treatment of GvHD--can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3(6): 302 – 314
- 45 *Heshmati F.* Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus. Apher. Sci* 2003; 29(1): 61 – 70
- 46 *Yoo EK, Rook AH, Elenitsas R, Gasparro FP, Vowels BR.* Apoptosis induction of ultraviolet light A and photochemotherapy in cutaneous T-cell Lymphoma: relevance to mechanism of therapeutic action. *J. Invest. Dermatol* 1996; 107(2): 235 – 242
- 47 *Dive C, Hickman JA.* Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death? *Br. J. Cancer* 1991; 64(1): 192 – 196
- 48 *Hickman JA.* Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 1992; 11(2): 121 – 139
- 49 *Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.* Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013 – 2026
- 50 *Trautinger F, Knobler R, Willemze R et al.* EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome. *Eur. J. Cancer* 2006; 42(8): 1014 – 1030
- 51 *kScarlsbrick JJ.* Staging and management of cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 2006; 31(2): 181 – 186
- 52 *Knobler RM, Trautinger F, Graninger W et al.* Parenteral administration of 8-methoxypsoralen in photopheresis. *J. Am. Acad. Dermatol* 1993; 28(4): 580 – 584

- 53 Zic JA. The treatment of cutaneous T-cell lymphoma with photopheresis. *Dermatol Ther* 2003; 16(4): 337 – 346
- 54 Rook AH, Prystowsky MB, Cassin M, Boufal M, Lessin SR. Combined therapy for Sézary syndrome with extracorporeal photochemotherapy and low-dose interferon alfa therapy. Clinical, molecular, and immunologic observations. *Arch Dermatol* 1991; 127(10): 1535 – 1540
- 55 Talpur R, Ward S, Apisarnthanarax N, Breuer-Mcham J, Duvic M. Optimizing bexarotene therapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2002; 47(5): 672 – 684
- 56 Bouwhuis SA, Markovic SN, McEvoy MT, Pittelkow MR. Extracorporeal photopheresis and adjuvant aerosolized granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for Sézary syndrome. *Mayo Clin. Proc.* 2002; 77(2): 197 – 200
- 57 McGinnis KS, Ubriani R, Newton S et al. The addition of interferon gamma to oral bexarotene therapy with photopheresis for Sézary syndrome. *Arch Dermatol* 2005; 141(9): 1176 – 1178
- 58 Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, Schmid C, Passweg J, Urbano-Ispizua A. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 2002; 100(7): 2374 – 2386
- 59 Devergie A 2004. Graft vs Host Disease. In: . Genoa: Forum Service Editore: 163 – 176
- 60 Dall'Amico R, Messina C. Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Ther Apher* 2002; 6(4): 296 – 304
- 61 Messina C, Locatelli F, Lanino E et al. Extracorporeal photochemotherapy for paediatric patients with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2003; 122(1): 118 – 127
- 62 Greinix HT, Volc-Platzer B, Kalhs P et al. Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood* 2000; 96(7): 2426 – 2431
- 63 Rubegni P, Cuccia A, Sbrano P et al. Role of extracorporeal photochemotherapy in patients with refractory chronic graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* 2005; 130(2): 271 – 275
- 64 Knobler R, Jantschitsch C. Extracorporeal photochemoimmunotherapy in cutaneous T-cell lymphoma. *Transfus. Apher. Sci* 2003; 28(1): 81 – 89
- 65 Marks DI, Rockman SP, Oziemski MA, Fox RM. Mechanisms of lymphocytotoxicity induced by extracorporeal photochemotherapy for cutaneous T cell lymphoma. *J. Clin. Invest* 1990; 86(6): 2080 – 2085

- 66 Vowels BR, Cassin M, Boufal MH, Walsh LJ, Rook AH. Extracorporeal photochemotherapy induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by monocytes: implications for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma and systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol* 1992; 98(5): 686 – 692
- 67 Heshmati F, Andreu G. Extracorporeal photochemotherapy: a historical perspective. *Transfus. Apher. Sci* 2003; 28(1): 25 – 34
- 68 Edelson RL. Cutaneous T cell lymphoma: the helping hand of dendritic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2001; 941: 1 – 11
- 69 Suchin KR, Cassin M, Washko R et al. Extracorporeal photochemotherapy does not suppress T- or B-cell responses to novel or recall antigens. *J. Am. Acad. Dermatol* 1999; 41(6): 980 – 986
- 70 Berger CL, Xu AL, Hanlon D et al. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int. J. Cancer* 2001; 91(4): 438 – 447
- 71 French LE, Alcindor T, Shapiro M et al. Identification of amplified clonal T cell populations in the blood of patients with chronic graft-versus-host disease: positive correlation with response to photopheresis. *Bone Marrow Transplant* 2002; 30(8): 509 – 515
- 72 Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K et al. Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *J. Immunol* 2005; 174(10): 5968 – 5976
- 73 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol* 1995; 155(3): 1151 – 1164
- 74 Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat. Med* 2003; 9(9): 1144 – 1150
- 75 Clark FJ, Gregg R, Piper K et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Blood* 2004; 103(6): 2410 – 2416
- 76 Lamioni A, Parisi F, Isacchi G et al. The immunological effects of extracorporeal photopheresis unraveled: induction of tolerogenic dendritic cells in vitro and regulatory T cells in vivo. *Transplantation* 2005; 79(7): 846 – 850
- 77 Tokura Y. Modulation of cytokine production by 8-methoxypsoralen and UVA. *J. Dermatol. Sci* 1999; 19(2): 114 – 122

- 78 *Di Renzo M, Rubegni P, Aloe G de et al.* Extracorporeal photochemotherapy restores Th1/Th2 imbalance in patients with early stage cutaneous T-cell lymphoma. *Immunology* 1997; 92(1): 99 – 103
- 79 *Jacob M, Manches O, Drillat P et al.* Quality control for the validation of extracorporeal photopheresis process using the Vilbert-Lourmat UV-A irradiation's system. *Transfus. Apher. Sci* 2003; 28(1): 63 – 70
- 80 Miltenyi Biotec BGD. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood by density gradient centrifugation. Technical Data Sheet
- 81 *Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G.* Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. 2. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2007
- 82 *Lottspeich F, Engels JW.* Bioanalytik. 2. Aufl. München ;, Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., 2006
- 83 *Homburg CH, Haas M de, dem Borne AE von, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D.* Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood* 1995; 85(2): 532 – 540
- 84 *Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84(5): 1415 – 1420
- 85 *Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 1995; 184(1): 39 – 51
- 86 GE Healthcare MD. Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System, version 2. Product Booklet
- 87 *Azuma M, Yssel H, Phillips JH, Spits H, Lanier LL.* Functional expression of B7/BB1 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med* 1993; 177(3): 845 – 850
- 88 *Engel P, Gribben JG, Freeman GJ et al.* The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen. *Blood* 1994; 84(5): 1402 – 1407
- 89 *Korff T, Aufgebauer K, Hecker M.* Cyclic stretch controls the expression of CD40 in endothelial cells by changing their transforming growth factor-beta1 response. *Circulation* 2007; 116(20): 2288 – 2297
- 90 *Murugaiyan G, Martin S, Saha B.* Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression. *Clin. Exp. Immunol* 2007; 149(1): 194 – 202
- 91 *Barclay AN.* The leucocyte antigen factsbook. 2. Aufl. San Diego (Calif.): Academic Press; Harcourt Brace & Co., op. 1997

- 92 Skelly RR, Munkenbeck P, Morrison DC. Stimulation of T-independent antibody responses by hapten-lipopolysaccharides without repeating polymeric structure. *Infect. Immun* 1979; 23(2): 287 – 293
- 93 Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol* 2002; 3(2): 196 – 200
- 94 Pène J, Rahmoun M, Temmerman S, Yssel H. Use of anti-CD3/CD28 mAb coupled magnetic beads permitting subsequent phenotypic analysis of activated human T cells by indirect immunofluorescence. *J. Immunol. Methods* 2003; 283(1-2): 59 – 66
- 95 Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1991; 88(15): 6575 – 6579
- 96 June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* 1994; 15(7): 321 – 331
- 97 Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol* 2000; 165(11): 6037 – 6046
- 98 Hackstein H, Misterek J, Nockher A, Reiter A, Bein G, Woessmann W. Mini buffy coat photopheresis for children and critically ill patients with extracorporeal photopheresis contraindications. *Transfusion* 2009; 49(11): 2366 – 2373
- 99 Tokura Y, Seo N, Yagi H et al. Treatment of T lymphocytes with 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A induces transient but biologically active Th1-skewing cytokine production. *J. Invest. Dermatol* 1999; 113(2): 202 – 208
- 100 Bladon J, Taylor PC. Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines. *J. Dermatol. Sci.* 2006; 43(2): 85 – 94
- 101 Bladon J, Taylor PC. Extracorporeal photopheresis in cutaneous T-cell lymphoma and graft-versus-host disease induces both immediate and progressive apoptotic processes. *Br. J. Dermatol.* 2002; 146(1): 59 – 68
- 102 Hanlon DJ, Berger CL, Edelson RL. Photoactivated 8-methoxypsoralen treatment causes a peptide-dependent increase in antigen display by transformed lymphocytes. *Int. J. Cancer* 1998; 78(1): 70 – 75
- 103 Boehncke WH, König K, Kaufmann R, Scheffold W, Prümmer O, Sterry W. Photodynamic therapy in psoriasis: suppression of cytokine production in vitro and recording of fluorescence modification during treatment in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* 1994; 286(6): 300 – 303

- 104 Tokura Y, Yagi J, Edelson RL, Gasparro FP. Inhibitory effect of 8-methoxypsoralen plus ultraviolet-A on interleukin-1 production by murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53(4): 517 – 523
- 105 Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007; 14(1): 32 – 43
- 106 Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356(6372): 768 – 774
- 107 Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22(53): 8543 – 8567
- 108 Yazdi AS, Ghoreschi K, Röcken M. Inflammasome activation in delayed-type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127(8): 1853 – 1855
- 109 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6): 821 – 832
- 110 Shornick LP, Togni P de, Mariathasan S et al. Mice deficient in IL-1beta manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene. *J. Exp. Med.* 1996; 183(4): 1427 – 1436
- 111 Antonopoulos C, Cumberbatch M, Dearman RJ, Daniel RJ, Kimber I, Groves RW. Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice. *J. Immunol.* 2001; 166(6): 3672 – 3677
- 112 Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V et al. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127(8): 1956 – 1963
- 113 Guarda G, Dostert C, Staehli F et al. T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. *Nature* 2009; 460(7252): 269 – 273
- 114 Waal Malefyt R de, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE de. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 1991; 174(5): 1209 – 1220
- 115 Willems F, Marchant A, Delville JP et al. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24(4): 1007 – 1009



## 9. Publikationsverzeichnis

### Abstract:

Adriana Peric, Gabriela Michel, Angelika Nockher, Gregor Bein, Holger Hackstein, Extracorporeal photopheresis promotes selective survival of CD14<sup>+</sup> monocytes and immunostimulatory IL-1 $\beta$  production, Abstractband "Transfusion Medicine and Hemotherapy" (S. Karger Verlag), 2013

### Vortrag:

Extracorporeal photopheresis promotes selective survival of CD14<sup>+</sup> monocytes and immunostimulatory IL-1 $\beta$  production, Vortrag für die 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) am 25. September 2013

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten, sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware, bzw. eines internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

---

---

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation, sein unermüdliches Engagement und die kompetente Beantwortung aller fachlichen und praktischen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Bein danke ich für die Schaffung der besten Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für die erwiesene Hilfsbereitschaft und Rat in praktischen ebenso wie fachlichen Fragen, namentlich Juliane Bechtel, Sabrina Immecke, Angela Briel, Gabriela Haley, Dr. Nelly Baal, Dr. Leo Hansmann und insbesondere Angelika Nokher für die stete Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Eltern für die kompromisslose Unterstützung während des gesamten Medizinstudiums und besonders während der Erstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Sharon Waisbrod, ohne dessen Unterstützung, stete Motivation und den Glauben in meine Fähigkeiten diese Arbeit nie entstanden wäre.